

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 411 907**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.08.2008 E 08797148 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.03.2013 EP 2182982**

54 Título: **Uso terapéutico de anticuerpos antirreceptor TWEAK**

30 Prioridad:

03.08.2007 US 953745 P

09.04.2008 US 123623 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

09.07.2013

73 Titular/es:

**FACET BIOTECH CORPORATION (100.0%)
1500 SEAPORT BOULEVARD
REDWOOD CITY, CA 94063, US**

72 Inventor/es:

CULP, PATRICIA

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 411 907 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Uso terapéutico de anticuerpos antirreceptor TWEAK.

5 **3. Antecedentes**

El receptor TWEAK (TweakR), también conocido como Fn14 o TNFRSF12A, es un miembro de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral. Se expresa sobre la superficie de células cancerosas derivadas de una variedad de tumores sólidos. La expresión de TweakR se puede detectar en algunos tejidos normales, incluyendo el riñón (cápsula de Bowman), el hígado (hepatocitos), y en células endoteliales proliferantes y fibroblastos (Meighan-Mantha, *et al.*, 1999, J. Biol. Chem. 1999; 274:33166-33176; y Jakubowski, *et al.*, 2002, J. Cell Sci. 2002; 115:267-274). La expresión de TweakR está aumentada por factores de crecimiento *in vitro* e *in vivo* en respuesta a lesión tisular, regeneración, e inflamación (Feng, *et al.*, 2000, Am. J. Pathol., 156:1253-1261; Wiley, *et al.*, 2001, Immunity, 15:837-846; y Desplat-Jego, *et al.*, 2005, J. Neuroimm., 133:116-123).

Se han dado a conocer el AND y las secuencias de aminoácidos que corresponden al TweakR (véanse, por ejemplo, la patente US nº 6.531.447, la patente US nº 6.824.773, la Publicación de Solicitud de Patente US nº 2006/0025574, la Publicación PCT nº WO 98/55508, la Publicación PCT nº WO 99/61471). De forma similar, se han dado a conocer métodos para obtener y usar antagonistas y agonistas de TweakR para modular la angiogénesis asociadas con trastornos inmunológicos y cáncer (véanse, por ejemplo, la patente US nº 6.727.225, la patente US nº 6.824.773, la patente US nº 7.001.992, la patente US nº 7.169.387, la patente US nº 7.208.151, la Publicación de Solicitud de Patente US nº 2005/0054047, la Publicación de Solicitud de Patente US nº 2005/0208046, la Publicación de Solicitud de Patente US nº 2006/0084143, la Publicación PCT nº WO 00/42073). Sin embargo, ninguno de estos informes han identificado anticuerpos monoclonales que se unen a TweakR y muestran efectos antitumorales. Estas deficiencias se han abordado, como se describe aquí, mediante la identificación de anticuerpos que se unen a TweakR, y la caracterización de sus actividades biológicas. La identificación de anticuerpos monoclonales anti-TweakR ha conducido al desarrollo de composiciones para el tratamiento de tumores sólidos, y también proporciona herramientas de cribado para uso de diagnóstico.

30 **4. Sumario**

La invención proporciona un anticuerpo anti-Tweak-R aislado o un fragmento de unión a antígeno del mismo,

en el que dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno puede inhibir o prevenir el crecimiento de un tumor sólido que expresa SEC ID nº: 2, en el que además dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende:

una CDR1 de cadena pesada codificada por una secuencia de aminoácidos que comprende la fórmula XaaYWMXaa (SEC ID nº 120), en la que Xaa en la posición 1 es S, N, o K y Xaa en la posición 5 es S o N;

una CDR2 de cadena pesada codificada por una secuencia de aminoácidos que comprende la fórmula EIRLKSDNYATHYAESXaaKG (SEC ID nº 121), en la que Xaa en la posición 17 es A o V;

una CDR3 de cadena pesada codificada por una secuencia de aminoácidos que comprende la fórmula XaaXaaADXaaXaaDY (SEC ID nº 122), en la que Xaa en la posición 1 es G, T, o Y, Xaa en la posición 2 es F o Y, Xaa en la posición 5 es A, T, o Y, y Xaa en la posición 6 es F o M;

una CDR1 de cadena ligera codificada por una secuencia de aminoácidos que comprende la fórmula XaaASQSVSTXaaYSYMXaa (SEC ID nº 127), en la que Xaa en la posición es 1 es R o K, Xaa en la posición 10 es S o T y Xaa en la posición 15 es H o Q;

una CDR2 de cadena ligera codificada por una secuencia de aminoácidos que comprende la fórmula YAXaaXaaLXaaS (SEC ID nº 128), en la que Xaa en la posición 3 es S o T, Xaa en la posición 4 es N o K, Xaa en la posición 6 es E o D; y,

una CDR3 de cadena ligera codificada por una secuencia de aminoácidos que comprende la fórmula QHSWEXaaPYT (SEC ID nº 129), en la que Xaa en la posición 6 es I o L.

Se proporcionan aquí composiciones que comprenden anticuerpos monoclonales y humanizados, o sus fragmentos de unión a antígeno, que se unen a TweakR humano, y métodos para su uso en terapia, tal como para tratar cáncer.

Los anticuerpos monoclonales o humanizados anti-TweakR se pueden generar a partir de ácidos nucleicos que codifican polipéptidos de anticuerpos anti-TweakR monoclonales o humanizados, que tienen 65%, 75%, 85%, 90%, 95%, 97% o 99% o más de identidad de secuencia con una o más de las secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en SEC ID nº: 3-12. El ácido nucleico puede codificar un polipéptido de un anticuerpo anti-

TweakR monoclonal o humanizado que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID nº: 3-12.

5 En otras formas de realización, los anticuerpos monoclonales o humanizados anti-TweakR pueden derivar de polipéptidos que tienen 65%, 75%, 85%, 90%, 95%, 97% o 99% o más de identidad de secuencia con una o más de las secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en SEC ID nº: 3-10. En algunas formas de realización, el polipéptido comprende una o más de las secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en SEC ID nº: 3-10.

10 En algunas formas de realización, las composiciones comprenden anticuerpos monoclonales de ratón anti-TweakR, o sus fragmentos de anticuerpos, en las que dicho anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada madura que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID nºS: 5, 7, o 9, y una región variable de cadena ligera madura que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID nº: 6, 8 ó 10.

15 En algunas formas de realización, las composiciones comprenden anticuerpos humanizados anti-TweakR o sus fragmentos de anticuerpos, en las que dicho anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada madura que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 3, y una región variable de cadena ligera madura que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 4.

20 En algunas formas de realización, las composiciones comprenden anticuerpos monoclonales o humanizados anti-TweakR, o sus fragmentos de anticuerpos, en las que dicho anticuerpo comprende una región variable que determina la complementariedad de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID nº: 13-22, 25-30 y 120-122, y una región de complementariedad de la cadena ligera madura que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID nº: 25 66-81, 83 y 127-129. Adicionalmente, las composiciones pueden comprender una región de entramado de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID nº: 31-65 y 123-126, y/o una región de entramado de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID nº: 84-119 y 130-133. Los anticuerpos pueden comprender todas las regiones que determinan la complementariedad del dominio variable de la cadena pesada y/o ligera de un anticuerpo anti-TweakR descrito en la presente memoria, opcionalmente en los que también están presentes una o más de las regiones de entramado que rodean a las regiones que determinan la complementariedad. En algunas formas de realización, están presentes las regiones que determinan la complementariedad tanto de las regiones variables de la cadena pesada como de la cadena ligera.

35 En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno se une a un epítipo de TweakR humano reconocido por el anticuerpo humanizado anti-TweakR, PDL192, en el que el epítipo comprende un R en la posición 56 de SEC ID nº: 2. PDL192 y otros anticuerpos que son capaces de unirse al epítipo de TweakR que comprende un R en la posición 56 son capaces de exterminar células que expresan TweakR.

40 Aunque se han descrito anticuerpos anti-TweakR, los anticuerpos anti-TweakR descritos aquí tienen un número de características útiles, incluyendo la puesta en marcha de la apoptosis y/o la estimulación de citotoxicidad celular mediada por anticuerpos (ADCC) en células que expresan TweakR. Las células que expresan TweakR incluyen células cancerosas de cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer pulmonar, melanoma, cáncer pancreático, cáncer de cabeza y cuello, cáncer ovárico, cáncer de estómago, cáncer uterino, cáncer cervical, cáncer de esófago, cáncer de células renales, glioblastoma, y sarcomas.

45 En consecuencia, las composiciones descritas en la presente memoria se pueden usar para inhibir la proliferación y/o exterminar células que expresan TweakR. Por ejemplo, en algunas formas de realización, las composiciones descritas en la presente memoria se pueden usar para tratar a un individuo que sufre cáncer, incluyendo, pero sin limitarse a, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer pulmonar, melanoma, cáncer pancreático, cáncer ovárico, cáncer renal, cáncer de cabeza y cuello, cáncer esofágico, cáncer uterino, cáncer de estómago, cáncer cervical, glioblastoma, y sarcomas.

50 La persona experta apreciará que una o más características específicas de cualquier realización descrita en la presente memoria se pueden combinar con una o más características de cualquier otra realización descrita en la presente memoria.

5. Breve descripción de las figuras

60 La figura 1A proporciona el ácido nucleico (SEC ID nº: 1), y la figura 1B proporciona la secuencia de aminoácidos de TweakR (SEC ID nº: 2);

65 la figura 2A proporciona la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (SEC ID nº: 3) y de la región variable de la cadena ligera (SEC ID nº: 4) del anticuerpo anti-TweakR humanizado, PDL192;

la figura 2B proporciona la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (SEC ID nº: 5) y de la región variable de la cadena ligera (SEC ID nº: 6) del anticuerpo anti-TweakR murino 19.2.1;

5 la figura 2C proporciona la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (SEC ID nº: 7) y de la región variable de la cadena ligera (SEC ID nº: 8) del anticuerpo anti-TweakR murino 18.3.3;

la figura 2D proporciona la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (SEC ID nº: 9) y de la región variable de la cadena ligera (SEC ID nº: 10) del anticuerpo anti-TweakR murino 136.1;

10 la figura 2E proporciona la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (SEC ID nº: 11) y de la región variable de la cadena ligera (SEC ID nº: 12) del anticuerpo anti-TweakR humanizado, PDL400;

15 la figura 3A proporciona las secuencias de aminoácidos de la región que determina la complementariedad 1 (CDR1) de la cadena pesada para el anticuerpo anti-TweakR humanizado, PDL192 (SEC ID nº: 13), anticuerpo anti-TweakR murino, 19.2.1 (SEC ID nº: 14), anticuerpo anti-TweakR murino, 136.1 (SEC ID nº: 15), anticuerpo anti-TweakR murino, 18.3.3 (SEC ID nº: 16), anticuerpo anti-TweakR murino, ITEM-3 (SEC ID nº: 17), y anticuerpo anti-TweakR murino, ITEM-1 (SEC ID nº: 18);

20 la figura 3B proporciona las secuencias de aminoácidos de la CDR2 de la cadena pesada para el anticuerpo anti-TweakR humanizado, PDL192 (SEC ID nº: 19), anticuerpo anti-TweakR murino, 19.2.1 (SEC ID nº: 20), anticuerpo anti-TweakR murino, 136.1 (SEC ID nº: 21), anticuerpo anti-TweakR murino, 18.3.3 (SEC ID nº: 22), anticuerpo anti-TweakR murino, ITEM-3 (SEC ID nº: 23), y anticuerpo anti-TweakR murino, ITEM-1 (SEC ID nº: 24);

25 la figura 3C proporciona las secuencias de aminoácidos de la CDR3 de la cadena pesada para el anticuerpo anti-TweakR humanizado, PDL192 (SEC ID nº: 25), anticuerpo anti-TweakR murino, 19.2.1 (SEC ID nº: 26), anticuerpo anti-TweakR murino, 136.1 (SEC ID nº: 27), anticuerpo anti-TweakR murino, 18.3.3 (SEC ID nº: 28), anticuerpo anti-TweakR murino, ITEM-3 (SEC ID nº: 29), y anticuerpo anti-TweakR murino, ITEM-1 (SEC ID nº: 30);

30 la figura 3D proporciona las secuencias de aminoácidos de la región de entramado 1 (FR1) de la cadena pesada para el anticuerpo anti-TweakR humanizado, PDL192 (SEC ID nº: 31), anticuerpo anti-TweakR humanizado, PDL192-2 (SEC ID nº: 32), anticuerpo anti-TweakR murino, 19.2.1 (SEC ID nº: 33), anticuerpo anti-TweakR murino, 136.1 (SEC ID nº: 34), anticuerpo anti-TweakR murino, 18.3.3 (SEC ID nº: 35), anticuerpo anti-TweakR humanizado, PDL183 (SEC ID nº: 36), anticuerpo anti-TweakR humanizado, PDL183-2 (SEC ID nº: 37), anticuerpo anti-TweakR murino, ITEM-3 (SEC ID nº: 38), y anticuerpo anti-TweakR murino, ITEM-1 (SEC ID nº: 39);

40 la figura 3E proporciona las secuencias de aminoácidos de la FR2 de la cadena pesada para el anticuerpo anti-TweakR humanizado, PDL192 (SEC ID nº: 40), anticuerpo anti-TweakR humanizado, PDL192-2 (SEC ID nº: 41), anticuerpo anti-TweakR murino, 19.2.1 (SEC ID nº: 42), anticuerpo anti-TweakR murino, 136.1 (SEC ID nº: 43), anticuerpo anti-TweakR murino, 18.3.3 (SEC ID nº: 44), anticuerpo anti-TweakR humanizado, PDL183 (SEC ID nº: 45), anticuerpo anti-TweakR humanizado, PDL183-2 (SEC ID nº: 46), anticuerpo anti-TweakR murino, ITEM-3 (SEC ID nº: 47), y anticuerpo anti-TweakR murino, ITEM-1 (SEC ID nº: 48);

45 la figura 3F proporciona las secuencias de aminoácidos de la FR3 de la cadena pesada para el anticuerpo anti-TweakR humanizado, PDL192 (SEC ID nº: 49), anticuerpo anti-TweakR humanizado, PDL192-2 (SEC ID nº: 50), anticuerpo anti-TweakR murino, 19.2.1 (SEC ID nº: 51), anticuerpo anti-TweakR murino, 136.1 (SEC ID nº: 52), anticuerpo anti-TweakR murino, 18.3.3 (SEC ID nº: 53), anticuerpo anti-TweakR humanizado, PDL183 (SEC ID nº: 54), anticuerpo anti-TweakR humanizado, PDL183-2 (SEC ID nº: 55), anticuerpo anti-TweakR murino, ITEM-3 (SEC ID nº: 56), y anticuerpo anti-TweakR murino, ITEM-1 (SEC ID nº: 57);

55 la figura 3G proporciona las secuencias de aminoácidos de la FR4 de la cadena pesada para el anticuerpo anti-TweakR humanizado, PDL192 (SEC ID nº: 58), anticuerpo anti-TweakR murino, 19.2.1 (SEC ID nº: 59), anticuerpo anti-TweakR murino, 136.1 (SEC ID nº: 60), anticuerpo anti-TweakR murino, 18.3.3 (SEC ID nº: 61), anticuerpo anti-TweakR humanizado, PDL183 (SEC ID nº: 62), anticuerpo anti-TweakR humanizado, PDL183-2 (SEC ID nº: 63), anticuerpo anti-TweakR murino, ITEM-3 (SEC ID nº: 64), y anticuerpo anti-TweakR murino, ITEM-1 (SEC ID nº: 65);

60 la figura 4A proporciona las secuencias de aminoácidos de la CDR1 de la cadena pesada para el anticuerpo anti-TweakR humanizado, PDL192 (SEC ID nº: 66), anticuerpo anti-TweakR murino, 19.2.1 (SEC ID nº: 67), anticuerpo anti-TweakR murino, 136.1 (SEC ID nº: 68), anticuerpo anti-TweakR murino, 18.3.3 (SEC ID nº: 69), anticuerpo anti-TweakR murino, ITEM-3 (SEC ID nº: 70), y anticuerpo anti-TweakR murino, ITEM-1 (SEC ID nº: 71);

65

la figura 4B proporciona las secuencias de aminoácidos de la CDR2 de la cadena pesada para el anticuerpo anti-TweakR humanizado, PDL192 (SEC ID nº: 72), anticuerpo anti-TweakR murino, 19.2.1 (SEC ID nº: 73), anticuerpo anti-TweakR murino, 136.1 (SEC ID nº: 74), anticuerpo anti-TweakR murino, 18.3.3 (SEC ID nº: 75), anticuerpo anti-TweakR murino, ITEM-3 (SEC ID nº: 76), y anticuerpo anti-TweakR murino, ITEM-1 (SEC ID nº: 77);

la figura 4C proporciona las secuencias de aminoácidos de la CDR3 de la cadena pesada para el anticuerpo anti-TweakR humanizado, PDL192 (SEC ID nº: 78), anticuerpo anti-TweakR murino, 19.2.1 (SEC ID nº: 79), anticuerpo anti-TweakR murino, 136.1 (SEC ID nº: 80), anticuerpo anti-TweakR murino, 18.3.3 (SEC ID nº: 81), anticuerpo anti-TweakR murino, ITEM-3 (SEC ID nº: 82), y anticuerpo anti-TweakR murino, ITEM-1 (SEC ID nº: 83);

la figura 4D proporciona las secuencias de aminoácidos de la FR1 de la cadena pesada para el anticuerpo anti-TweakR humanizado, PDL192 (SEC ID nº: 84), anticuerpo anti-TweakR humanizado, PDL192-2 (SEC ID nº: 85), anticuerpo anti-TweakR murino, 19.2.1 (SEC ID nº: 86), anticuerpo anti-TweakR murino, 136.1 (SEC ID nº: 87), anticuerpo anti-TweakR murino, 18.3.3 (SEC ID nº: 88), anticuerpo anti-TweakR humanizado, PDL183 (SEC ID nº: 89), anticuerpo anti-TweakR humanizado, PDL183-2 (SEC ID nº: 90), anticuerpo anti-TweakR murino, ITEM-3 (SEC ID nº: 91), y anticuerpo anti-TweakR murino, ITEM-1 (SEC ID nº: 92);

la figura 4E proporciona las secuencias de aminoácidos de la FR2 de la cadena pesada para el anticuerpo anti-TweakR humanizado, PDL192 (SEC ID nº: 93), anticuerpo anti-TweakR humanizado, PDL192-2 (SEC ID nº: 94), anticuerpo anti-TweakR murino, 19.2.1 (SEC ID nº: 95), anticuerpo anti-TweakR murino, 136.1 (SEC ID nº: 96), anticuerpo anti-TweakR murino, 18.3.3 (SEC ID nº: 97), anticuerpo anti-TweakR humanizado, PDL183 (SEC ID nº: 98), anticuerpo anti-TweakR humanizado, PDL183-2 (SEC ID nº: 99), anticuerpo anti-TweakR murino, ITEM-3 (SEC ID nº: 100), y anticuerpo anti-TweakR murino, ITEM-1 (SEC ID nº: 101);

la figura 4F proporciona las secuencias de aminoácidos de la FR3 de la cadena pesada para el anticuerpo anti-TweakR humanizado, PDL192 (SEC ID nº: 102), anticuerpo anti-TweakR humanizado, PDL192-2 (SEC ID nº: 103), anticuerpo anti-TweakR murino, 19.2.1 (SEC ID nº: 104), anticuerpo anti-TweakR murino, 136.1 (SEC ID nº: 105), anticuerpo anti-TweakR murino, 18.3.3 (SEC ID nº: 106), anticuerpo anti-TweakR humanizado, PDL183 (SEC ID nº: 107), anticuerpo anti-TweakR humanizado, PDL183-2 (SEC ID nº: 108), anticuerpo anti-TweakR murino, ITEM-3 (SEC ID nº: 109), y anticuerpo anti-TweakR murino, ITEM-1 (SEC ID nº: 110);

la figura 4G proporciona las secuencias de aminoácidos de la FR4 de la cadena pesada para el anticuerpo anti-TweakR humanizado, PDL192 (SEC ID nº: 111), anticuerpo anti-TweakR humanizado, PDL192-2 (SEC ID nº: 112), anticuerpo anti-TweakR murino, 19.2.1 (SEC ID nº: 113), anticuerpo anti-TweakR murino, 136.1 (SEC ID nº: 114), anticuerpo anti-TweakR murino, 18.3.3 (SEC ID nº: 115), anticuerpo anti-TweakR humanizado, PDL183 (SEC ID nº: 116), anticuerpo anti-TweakR humanizado, PDL183-2 (SEC ID nº: 117), anticuerpo anti-TweakR murino, ITEM-3 (SEC ID nº: 118), y anticuerpo anti-TweakR murino, ITEM-1 (SEC ID nº: 119);

la figura 5 proporciona las secuencias de consenso de CDR y FR para anticuerpos anti-TweakR;

la figura 6 proporciona un perfil de expresión génica ejemplar de la expresión del gen anti-TweakR en una variedad de tumores sólidos. El eje X representa muestras individuales evaluadas en el chip génico, y el eje Y indica la intensidad media de la expresión de TweakR para cada muestra;

la figura 7 representa una tinción inmunohistológica de células tumorales que expresan TweakR con el anticuerpo anti-TweakR 29.T10;

la figura 8A representa la liberación de IL-8 por los anticuerpos anti-TweakR ITEM1, ITEM2, ITEM3, ITEM4 y los controles isotípicos;

la figura 8B representa la liberación de IL-8 por el anticuerpo anti-Tweak R PDL192;

la figura 8C representa la liberación de IL-8 por el anticuerpo anti-Tweak R 18.3.3;

la figura 8D representa la liberación de IL-8 por el anticuerpo anti-Tweak R 136.1;

la figura 8E representa la liberación de IL-8 por el anticuerpo anti-Tweak R PDL400;

la figura 9 representa un ensayo antiproliferativo típico que usa el anticuerpo anti-TweakR, 19.2.1;

Las figura 10A-10B proporcionan ejemplos mediante los cuales los anticuerpos anti-TweakR PDL192 (figura 10A) y 136.1 (10B) inhiben el crecimiento celular induciendo apoptosis a través de la activación de caspasa;

la figura 11 representa la actividad antitumoral de PDL192 en el modelo de xenoinjerto de célula renal SN12C;

- la figura 12 representa un estudio de búsqueda de intervalo de dosis con 19.2.1 en el modelo de xenoinjerto de A253 de cáncer de cabeza y cuello;
- 5 la figura 13 representa la actividad antitumoral usando 19.2.1 en un régimen de dosificación crónica en el modelo A253 de cáncer de cabeza y cuello;
- la figura 14 representa la actividad antitumoral de PDL192 en el modelo de xenoinjerto de vejiga urinaria HT1376;
- 10 la figura 15 representa la actividad antitumoral en un estudio de búsqueda del intervalo de dosis con PDL192 en el modelo del xenoinjerto de melanoma A375;
- la figura 16 representa la actividad antitumoral de PDL192 en el modelo de xenoinjerto ovárico CSOC;
- 15 la figura 17 representa la actividad antitumoral de PDL192 ± gemcitabina en el modelo de xenoinjerto Panc1;
- las figuras 18A-18D representan la actividad antitumoral de PDL192 ± irinotecán ± cetuximab en el modelo de xenoinjerto HT29;
- 20 las figuras 19A-19B representan la actividad antitumoral y antimetastásica de PDL192 en un modelo de cáncer de mama que usa el xenoinjerto variante MDA-MB-231;
- las figuras 20A-20B representan la actividad ADCC del anticuerpo anti-TweakR PDL192 sobre transfectantes TweakR (figura 20A) y células de cáncer renal SN12C (figura 20B) usando PBMCs humanas como células efectoras;
- 25 la figura 20C representa la actividad ADCC del anticuerpo anti-TweakR PDL192 sobre transfectantes TweakR usando esplenocitos de ratón como células efectoras;
- 30 las figuras 21A-21B representan la actividad antitumoral del isotipo IgG1 murino (19.2.1xG1) y del isotipo IgG2a murino (19.2.1) en el modelo de xenoinjerto renal SN12C (figura 21A) y en el modelo de xenoinjerto de melanoma A375 (figura 21B); y
- 35 las figuras 22A-22B representan la unión de anticuerpo anti-TweakR a TweakR humano, TweakR (R56P) humano y TweakR de ratón.

6. Descripción detallada

- 40 Se entenderá que tanto la descripción general anterior como la siguiente descripción detallada son solamente ejemplares y explicativas, y no son restrictivas de las composiciones y métodos descritos en la presente memoria. En esta solicitud, el uso del singular incluye el plural, excepto que se señale específicamente de otro modo. También, el uso de "o" significa "y/o", excepto que se señale de otro modo. De forma similar, "comprender", "comprende", "que comprende", "incluir", "incluye" y "que incluye" no pretenden ser limitantes.

45 6.2 Definiciones

Como se usa en la presente memoria, los siguientes términos pretenden tener los siguientes significados:

- 50 Como se usa en la presente memoria, "anticuerpo" incluye la referencia a una molécula de inmunoglobulina inmunológicamente reactiva con un antígeno particular, que incluye anticuerpos tanto policlonales como monoclonales. El término también incluye formas manipuladas genéticamente mediante ingeniería, tales como anticuerpos quiméricos (por ejemplo, anticuerpos murinos humanizados) y anticuerpos heteroconjugados (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos). El término "anticuerpo" también incluye formas de unión a antígeno de los anticuerpos, incluyendo fragmentos con capacidad para unión al antígeno (por ejemplo Fab', F(ab')₂, Fab, Fv y rIgG). Véase también, Pierce Catalog and Handbook, 1994-1995 (Pierce Chemical Co., Rockford, Ill.). Véase tb, por ejemplo, Kuby, J., Immunology, 3ª Ed., W.H. Freeman & Co., Nueva York (1998). El término también se refiere a fragmentos Fv monocatenarios (scFv) recombinantes. El término anticuerpo también incluye moléculas bivalentes o biespecíficas, dianticuerpos, trianticuerpos, y tetraanticuerpos. Las moléculas bivalentes y biespecíficas se describen, por ejemplo, en Kostelny *et al.* (1992) J Immunol 148:1547, Pack y Pluckthun (1992) Biochemistry 31:1579, Hollinger *et al.*, 1993, más arriba, Gruber *et al.* (1994) J Immunol: 5368, Zhu *et al.* (1997) Protein Sci 6:781, Hu *et al.* (1996) Cancer Res. 56:3055, Adams *et al.* (1993) Cancer Res. 53:4026, y McCartney, *et al.* (1995) Protein Eng. 8:301.

- 65 La expresión "anticuerpo monoclonal", como se usa aquí, no está limitada a anticuerpos producidos mediante tecnología de hibridoma. La expresión "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo que deriva de un único clon, incluyendo cualquier clon eucariota, procariota, o fágico, y no se refiere al método mediante el cual se produce.

Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar usando una amplia variedad de técnicas conocidas en la técnica, incluyendo el uso de tecnologías de hibridoma, recombinante, y de presentación de fagos, o una combinación de las mismas. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales se pueden producir usando técnicas de hibridoma, incluyendo aquellas conocidas en la técnica y enseñadas, por ejemplo, en Harlow y Lane, "Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (1988); Hammerling *et al.*, en: "Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas", Elsevier, N.Y. (1981), p. 563 681.

Un anticuerpo inmunológicamente reactivo con un antígeno particular se puede generar mediante métodos recombinantes tales como selección de librerías de anticuerpos recombinantes en fagos o vectores similares, véase, por ejemplo, Huse *et al.*, Science 246: 1275-1281 (1989); Ward *et al.*, Nature 341:544-546 (1989); y Vaughan *et al.*, Nature Biotech. 14:309-314 (1996), o inmunizando un animal con el antígeno o con ADN que codifica el antígeno. Los métodos para producir y cribar anticuerpos específicos usando tecnología de hibridoma son habituales y bien conocidos en la técnica. En un ejemplo no limitante, se pueden inmunizar ratones con un antígeno de interés o una célula que expresa tal antígeno. Una vez que se detecta una respuesta inmunitaria, por ejemplo se detectan anticuerpos específicos para el antígeno en el suero del ratón, se cosecha el bazo del ratón y se aíslan esplenocitos. Los esplenocitos se fusionan entonces mediante técnicas bien conocidas a cualesquiera células de mieloma adecuadas. Los hibridomas se seleccionan y clonan mediante dilución limitante. Los clones de hibridoma se evalúan entonces mediante métodos conocidos en la técnica para células que segregan anticuerpos capaces de unirse al antígeno. El fluido ascítico, que generalmente contiene niveles elevados de anticuerpos, se puede generar inoculando intraperitonealmente a ratones con clones de hibridoma positivos.

Típicamente, una inmunoglobulina tiene una cadena pesada y una cadena ligera. Cada una de las cadenas pesada y ligera contiene una región constante y una región variable, (las regiones son también conocidas como "dominios"). Las regiones variables de la cadena ligera y de la cadena pesada contienen cuatro regiones de "entramado" interrumpidas por tres regiones hipervariables, también denominadas "regiones que determinan la complementariedad" o "CDR". Las secuencias de las regiones de entramado de las diferentes cadenas ligera o pesada están relativamente conservadas en una especie. La región de entramado de un anticuerpo, esto es, las regiones de entramado combinadas de las cadenas ligera y pesada constituyentes, sirve para situar y alinear las CDR en el espacio tridimensional.

Las CDR son principalmente responsables de la unión a un epítipo de un antígeno. Las CDR de cada cadena se denomina típicamente como CDR1, CDR2, y CDR3, numeradas secuencialmente partiendo del término N, y también se identifican típicamente por la cadena en la que está situada la CDR particular. De este modo, una V_H CDR3 está situada en el dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo en el que se encuentra, mientras que una V_L CDR1 es la CDR1 del dominio variable de la cadena ligera del anticuerpo en el que se encuentra.

Las referencias a " V_H " se refieren a la región variable de una cadena pesada inmunoglobulínica de un anticuerpo, incluyendo la cadena pesada de un Fv, scFv, o Fab. Las referencias a " V_L " se refieren a la región variable de una cadena ligera inmunoglobulínica, incluyendo la cadena ligera de un Fv, scFv, dsFv o Fab.

La frase "Fv monocatenario" o "scFv" se refiere a un anticuerpo en el que los dominios variables de la cadena pesada y de la cadena ligera de un anticuerpo bicatenario tradicional se han unido para formar una sola cadena. Típicamente, se inserta un péptido ligador entre las dos cadenas para permitir el plegamiento apropiado y la creación de un sitio de unión activo.

Un "anticuerpo quimérico" es una molécula inmunoglobulínica en la que (a) la región constante, o una porción de la misma, está alterada, sustituida o intercambiada de manera que el sitio de unión a antígeno (región variable) está enlazado a una región constante de una clase, función efectora y/o especie diferente o alterada, o a una molécula totalmente diferente que confiere nuevas propiedades al anticuerpo quimérico, por ejemplo una enzima, toxina, hormona, factor de crecimiento, fármaco, etc. o (b) la región variable, o una porción de la misma, está alterada, sustituida o intercambiada con una región variable que tiene una especificidad antigénica diferente o alterada. Cualquiera de los anticuerpos anti-TweakR descritos aquí puede ser quimérico.

La expresión "anticuerpo humanizado" o "inmunoglobulina humanizada" se refiere a una inmunoglobulina que comprende un entramado humano, al menos una y preferiblemente todas las regiones que determinan la complementariedad (CDR) de un anticuerpo no humano, y en el que cualquier región constante presente es sustancialmente idéntica a una región constante de inmunoglobulina humana, es decir, al menos alrededor de 85%, al menos 90%, y al menos 95% idéntica. Por tanto, todas las partes de una inmunoglobulina humanizada, excepto posiblemente las CDR, son sustancialmente idénticas a las partes correspondientes de una o más secuencias de inmunoglobulinas humanas nativas. A menudo, los restos del entramado en las regiones de entramado humanas se sustituirán por el resto correspondiente procedente del anticuerpo dador de CDR, para alterar, preferiblemente mejorar, la unión al antígeno. Estas sustituciones del entramado se identifican mediante métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo formando modelos de las interacciones de la CDR y restos del entramado para identificar restos del entramado importantes para la unión al antígeno, y mediante comparación de secuencias para identificar restos del entramado inusuales en posiciones particulares. Véanse, por ejemplo, Queen *et al.*, patentes US n^{os}: 5.530.101; 5.585.089; 5.693.761; 5.693.762; 6.180.370. Los anticuerpos se pueden humanizar usando una variedad

de técnicas conocidas en la técnica, incluyendo, por ejemplo, trasplante de las CDR (documento EP 239.400; publicación PCT WO 91/09967; patentes US nºs 5.225.539; 5.530.101 y 5.585.089), sustitución selectiva de restos en la superficie (documentos EP 592.106; EP 519.596; Padlan, *Mol. Immunol.*, 28:489 498 (1991); Studnicka *et al.*, *Prot. Eng.* 7:805 814 (1994); Roguska *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91:969 973 (1994), y recombinación aleatoria de cadenas (patente US nº 5.565.332). Los anticuerpos anti-TweakR descritos aquí incluyen anticuerpos humanizados, tales como anticuerpos humanizados de ratón, anticuerpos completamente humanos, y anticuerpos de ratón.

“Epítipo” o “determinante antigénico” se refiere a un sitio en un antígeno al que se une un anticuerpo. Los epítipos pueden estar formados tanto de aminoácidos contiguos como de aminoácidos no contiguos yuxtapuestos mediante plegamiento terciario de una proteína. Los epítipos formados a partir de aminoácidos contiguos son retenidos típicamente al exponerlos a disolventes desnaturizantes, mientras que los epítipos formados mediante plegamiento terciario se pierden típicamente en el tratamiento con disolventes desnaturizantes. Un epítipo incluye típicamente al menos 3, y más habitualmente al menos 5 u 8-10 aminoácidos en una conformación espacial única. Los métodos para determinar la conformación espacial de epítipos incluyen, por ejemplo, cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear bidimensional. Véase, por ejemplo, *Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology*, Vol. 66, Glenn E. Morris, Ed (1996).

La determinación de si dos anticuerpos se unen sustancialmente al mismo epítipo se logra mediante los métodos conocidos en la técnica, tales como un ensayo de competición. Al llevar a cabo un estudio de competición de anticuerpos entre un anticuerpo de control (por ejemplo, uno de los anticuerpos anti-TweakR descritos aquí) y cualquier anticuerpo de ensayo, primero se puede marcar el anticuerpo de control con un marcador detectable, tal como biotina, marcador enzimático, radioactivo, o marcador fluorescente, para permitir la identificación subsiguiente. Se mide la intensidad del marcador unido. Si el anticuerpo marcado compete con el anticuerpo no marcado por la unión a un epítipo solapante, la intensidad disminuirá con respecto a la unión mediante anticuerpo no marcado de control negativo.

Los términos “aislado”, “purificado”, o “biólogicamente puro” se refieren a material que está sustancial o esencialmente libre de componentes que normalmente lo acompañan como se encuentra en su estado nativo. La pureza y homogeneidad se determinan típicamente usando técnicas de química analítica, tales como electroforesis en gel de poliacrilamida o cromatografía de líquidos de altas prestaciones. Sustancialmente se purifica una proteína o ácido nucleico que es la especie predominante presente en una preparación. En particular, se separa un ácido nucleico aislado a partir de algunos marcos de lectura abiertos que flanquean de forma natural el gen y codifica proteínas distintas de la proteína codificada por el gen. El término “purificado”, en algunas formas de realización, significa que un ácido nucleico o proteína da lugar a esencialmente una banda en un gel electroforético. En algunas formas de realización, significa que el ácido nucleico o proteína es al menos 85% puro, al menos 95% puro, y al menos 99% puro. En otras formas de realización, “purificar” o “purificación” significa eliminar al menos un contaminante de la composición a purificar. En este sentido, la purificación no requiere que el compuesto purificado sea homogéneo, por ejemplo 100% puro.

Los términos “polipéptido”, “péptido” y “proteína” se usan aquí de forma intercambiable para referirse a un polímero de restos de aminoácidos. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o más restos de aminoácidos es un mimético químico artificial de un aminoácido de origen natural correspondiente, así como a polímeros de aminoácidos de origen natural, aquellos que contienen restos modificados, y polímero de aminoácidos de origen no natural.

El término “aminoácido” se refiere a aminoácidos de origen natural y sintéticos, así como a análogos de aminoácidos y a miméticos de aminoácidos que funcionan de forma similar a los aminoácidos de origen natural. Los aminoácidos de origen natural son aquellos codificados por el código genético, así como aquellos aminoácidos que se modifican más tarde, por ejemplo hidroxiprolina, gamma-carboxiglutamato, y O-fosfoserina. Los análogos de aminoácidos se refieren a compuestos que tienen la misma estructura química básica que un aminoácido de origen natural, por ejemplo un carbono alfa que está unido a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino, y un grupo R, por ejemplo homoserina, norleucina, metionina sulfóxido, metionina metil sulfonio. Tales análogos pueden tener grupos R modificados (por ejemplo, norleucina) o cadenas principales peptídicas modificadas, pero retienen la misma estructura química básica que un aminoácido de origen natural. Los miméticos de aminoácidos se refieren a compuestos químicos que tienen una estructura que es diferente de la estructura química general de un aminoácido, pero que funcionan de forma similar a un aminoácido de origen natural.

Los aminoácidos se pueden referir en la presente memoria por sus símbolos de tres letras habitualmente conocidos, o mediante los símbolos de una letra recomendados por la Comisión de Nomenclatura Bioquímica de la IUPAC-IUB. Igualmente, los nucleótidos se pueden referir aquí por sus códigos de una sola letra habitualmente aceptados.

La expresión “Variantes modificadas de forma conservativa” se aplica tanto a secuencias de aminoácidos como de ácidos nucleicos. Con respecto a secuencias de ácidos nucleicos particulares, las variantes modificadas de forma conservativa se refieren a aquellos ácidos nucleicos que codifican secuencias de aminoácidos idénticas o esencialmente idénticas, o, cuando el ácido nucleico no codifica una secuencia de aminoácidos, a secuencias esencialmente idénticas o asociadas, por ejemplo naturalmente contiguas. Debido a la degeneración del código

genético, un gran número de ácidos nucleicos funcionalmente idénticos codifican a la mayoría de las proteínas. Por ejemplo, los codones GCA, GCC, GCG y GCU codifican todos ellos el aminoácido alanina. De este modo, en cada posición donde una alanina está especificada por un codón, el codón se puede alterar a otro de los codones correspondientes descritos sin alterar el polipéptido codificado. Tales variaciones de ácidos nucleicos son

5 “variaciones silenciosas”, que son una especie de variaciones modificadas de forma conservativa. Cada secuencia de ácido nucleico aquí que codifica un polipéptido también describe variaciones silenciosas del ácido nucleico. Un experto reconocerá que, en ciertos contextos, cada codón en un ácido nucleico (excepto AUG, que es normalmente el único codón para metionina, y TGG, que es normalmente el único codón para triptófano) se puede modificar para producir una molécula funcionalmente idéntica.

10 En cuanto a las secuencias de aminoácidos, un experto reconocerá que sustituciones, supresiones o adiciones individuales a una secuencia de ácido nucleico, peptídica, polipeptídica o proteica, que alteran, añaden o suprimen un único aminoácido o un pequeño porcentaje de aminoácidos en la secuencia codificada, es una “variante modificada de forma conservativa”, en la que la alteración da como resultado la sustitución de un aminoácido por un aminoácido químicamente similar. Las tablas de sustituciones conservativas, que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares, son bien conocidas en la técnica. Tales variantes modificadas de forma conservativa son además y no excluyen variantes polimórficas, homólogos entre especies, y alelos de la invención. Las sustituciones conservativas entre sí incluyen típicamente, por ejemplo: 1) alanina (A), glicina (G); 2) ácido aspártico (D), ácido glutámico (E); 3) asparagina (N), glutamina (Q); 4) arginina (R), lisina (K); 5) isoleucina (I), leucina (L), metionina (M), valina (V); 6) fenilalanina (F), tirosina (Y), triptófano (W); 7) serina (S), treonina (T); y 8) cisteína (C), metionina (M) (véase, por ejemplo, Creighton, Proteins (1984)).

25 Un “marcador” o un “resto detectable” es una composición detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos, químicos, u otros medios físicos. Por ejemplo, los marcadores útiles incluyen colorantes fluorescentes, reactivos densos en electrones, enzimas (por ejemplo, como se usan habitualmente en un ELISA), biotina, digoxigenina, o haptenos y proteínas u otras entidades que se pueden hacer detectables, por ejemplo incorporando un radiomarcador en el péptido, o se pueden usar para detectar anticuerpos específicamente reactivos con el péptido. El radioisótopo puede ser, por ejemplo, ³H, ¹⁴C, ³²P, ³⁵S, o ¹²⁵I. En algunas formas de realización, los radioisótopos se usan como restos tóxicos.

30 Los marcadores se pueden incorporar en los anticuerpos en cualquier posición. Se puede emplear cualquier método conocido en la técnica para conjugar el anticuerpo al marcador, incluyendo aquellos métodos descritos por Hunter *et al.*, Nature, 144:945 (1962); David *et al.*, Biochemistry, 13:1014 (1974); Pain *et al.*, J. Immunol. Meth., 40:219 (1981); y Nygren, J. Histochem. y Cytochem., 30:407 (1982). La semivida de péptidos radiomarcados o de composiciones de anticuerpos radiomarcados se puede prolongar mediante la adición de sustancias que estabilizan el péptido o anticuerpo radiomarcado y lo protegen de la degradación. Se puede usar cualquier sustancia o combinación de sustancias que establezca el péptido o anticuerpo radiomarcado, incluyendo las sustancias descritas en la patente US nº 5.961.955.

40 El término “recombinante”, cuando se usa con referencia a, por ejemplo, una célula, o ácido nucleico, proteína, o vector, indica que la célula, ácido nucleico, proteína o vector se ha modificado mediante la introducción de un ácido nucleico o proteína heteróloga o la alteración de un ácido nucleico o proteína nativa, o que la célula deriva de una célula así modificada. De este modo, por ejemplo, las células recombinantes expresan genes que no se encuentran en la forma nativa (no recombinante) de la célula, o expresan genes nativos que son expresados de otro modo anormalmente, subexpresados o no expresados en absoluto. Por la expresión “ácido nucleico recombinante” se quiere decir aquí un ácido nucleico, originalmente formado *in vitro*, en general, mediante la manipulación de ácido nucleico, por ejemplo usando polimerasas y endonucleasas, en una forma no encontrada normalmente en la naturaleza. De esta manera, se logra el enlazamiento operablemente de secuencias diferentes. De este modo, un ácido nucleico aislado, en una forma lineal, o un vector de expresión formado *in vitro* ligando moléculas de ADN que no están unidas normalmente, se consideran ambos recombinantes para los fines de esta invención. Se entiende que una vez que se obtiene un ácido nucleico recombinante y se reintroduce en una célula hospedante u organismo, se replicará de forma no recombinante, es decir, usando la maquinaria celular *in vivo* de la célula hospedante en lugar de manipulaciones *in vitro*; sin embargo, tales ácidos nucleicos, una vez producidos recombinantemente, aunque subsiguientemente replicados de forma no recombinante, todavía son considerados recombinantes para los fines de esta invención. De forma similar, una “proteína recombinante” es una proteína obtenida usando técnicas recombinantes, es decir, a través de la expresión de un ácido nucleico recombinante como se representa anteriormente.

60 El término “heterólogo”, cuando se usa con referencia a porciones de un ácido nucleico, indica que el ácido nucleico comprende dos o más subsecuencias que no se encuentran normalmente en la misma relación entre sí en la naturaleza. Por ejemplo, el ácido nucleico se produce típicamente de forma recombinante, teniendo dos o más secuencias, por ejemplo, a partir de genes no relacionados dispuestos para obtener un ácido nucleico funcional nuevo, por ejemplo un promotor procedente de una fuente y una región codificante procedente de otra fuente. De forma similar, una proteína heteróloga se referirá a menudo a dos o más subsecuencias que no se encuentran en la misma relación entre sí en la naturaleza (por ejemplo, una proteína de fusión).

65

Un “promotor” se define como un conjunto de secuencias de control de ácidos nucleicos que dirige la transcripción de un ácido nucleico. Como se usa aquí, un promotor incluye secuencias de ácidos nucleicos necesarias próximas al sitio de comienzo de la transcripción, tal como, en el caso de un promotor de tipo polimerasa II, un elemento TATA. Un promotor también incluye opcionalmente elementos potenciadores o represores distales, que pueden estar situados tanto como varios miles de pares de bases desde el sitio de comienzo de la transcripción. Un promotor “constitutivo” es un promotor que es activo en la mayoría de las condiciones medioambientales y de desarrollo. Un promotor “inducible” es un promotor que es activo bajo regulación medioambiental o de desarrollo. La expresión “enlazado operablemente” se refiere a un enlace funcional entre una secuencia de control de la expresión de ácidos nucleicos (tal como un promotor, o un conjunto de sitios de unión de factores de transcripción) y una segunda secuencia de ácido nucleico, en el que la secuencia de control de la expresión dirige la transcripción del ácido nucleico que corresponde a la segunda secuencia.

Un “vector de expresión” es un constructo de ácido nucleico, generado recombinante o sintéticamente, con una serie de elementos de ácidos nucleicos específicos que permite la transcripción de un ácido nucleico particular en una célula hospedante. El vector de expresión puede ser parte de un plásmido, virus, o fragmento de ácido nucleico. Típicamente, el vector de expresión incluye un ácido nucleico a transcribir enlazado operablemente a un promotor.

La frase “se une específicamente (o selectivamente)” a un anticuerpo, o “específicamente (o selectivamente) inmunorreactivo con”, cuando se refiere a una proteína o péptido, se refiere a una reacción de unión que es determinante de la presencia de la proteína, en una población heterogénea de proteínas y otros productos biológicos. De este modo, en condiciones de inmunoensayo designadas, los anticuerpos específicos se unen a unas secuencias proteicas particulares al menos dos veces el valor de fondo, y más típicamente más de 10 a 100 veces el valor de fondo.

6.3 Descripción detallada

Las composiciones descritas aquí se basan en la identificación de anticuerpos anti-TweakR monoclonales y humanizados capaces de poner en marcha la apoptosis y/o de estimular ADCC en células que expresan TweakR. En particular, estos anticuerpos encuentran uso en composiciones farmacéuticas usadas para tratar cáncer.

6.4 Anticuerpos TweakR

Los anticuerpos anti-TweakR descritos aquí se unen específicamente a proteínas TweakR. Por “se unen específicamente” se quiere decir aquí que los anticuerpos se unen a la proteína con una K_D de al menos alrededor de 1 μ M, al menos alrededor de 0,1 μ M o mejor, al menos alrededor de 0,01 μ M, y al menos alrededor de 0,001 μ M o mejor. En algunas formas de realización, los anticuerpos descritos aquí son capaces de unirse selectivamente a la diana específica y no a secuencias relacionadas.

Por “proteínas TweakR” se quiere decir aquí que los anticuerpos anti-TweakR se pueden unir a una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos codificada por SEC ID n°: 1, o codificada por una secuencia de ácido nucleico que se puede hibridar a SEC ID n°: 1, o que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID n°: 2.

Los anticuerpos anti-TweakR descritos aquí son capaces de modular la actividad de un gen de TweakR o de ligando. En general, los anticuerpos muestran al menos una de las propiedades asociadas con agonistas y antagonistas de TweakR. Por “agonista” se quiere decir aquí un anticuerpo que es capaz de promover una o más actividades biológicas asociadas con TweakR. Por “antagonista” se quiere decir aquí un anticuerpo que es capaz de inhibir una o más actividades biológicas asociadas con TweakR y/o con la interacción TweakR-ligando. Propiedades biológicas asociadas con el TweakR incluyen, pero no se limitan a, actividad de pro-apoptosis, pro-proliferación, pro-migración y pro-inflamatoria (véanse, por ejemplo, Wiley, *et al.*, 2001, *Immunity*, 15:837-846, Wiley y Winkles, 2003, *Cytokine & Growth Factor Review*, 14:241-249; y Winkles, *et al.*, 2006, *Cancer Letters*, 235(1):11-7). En consecuencia, los anticuerpos anti-TweakR descritos aquí pueden mostrar actividad agonista entre 0% y 100%. Por ejemplo, en algunas formas de realización, los anticuerpos anti-TweakR pueden mostrar al menos alrededor de 0% de actividad agonista, al menos alrededor de 10% de actividad agonista, al menos alrededor de 20% de actividad agonista, al menos alrededor de 30% de actividad agonista, al menos alrededor de 40% de actividad agonista, al menos alrededor de 50% de actividad agonista, al menos alrededor de 60% de actividad agonista, al menos alrededor de 70% de actividad agonista, al menos alrededor de 80% de actividad agonista, al menos alrededor de 90% de actividad agonista, al menos alrededor de 1000% de actividad agonista. En algunas formas de realización, los anticuerpos anti-TweakR descritos aquí pueden mostrar una actividad agonista mayor del 100%.

La actividad agonista/antagonista se puede determinar midiendo la liberación de citocinas y/o quimiocinas en un ensayo de crecimiento celular *in vitro*. Por ejemplo, como se expone en los EJEMPLOS, en un ensayo típico, las células se incuban *in vitro* con un anticuerpo anti-TweakR \pm ligando TWEAK. Veinticuatro horas más tarde, el sobrenadante celular se evalúa para determinar la presencia de citocinas y/o quimiocinas usando un ensayo ELISA o un ensayo multiplex comercial a base de perlas fluorescentes (por ejemplo, Luminex®, Upstate).

Para caracterizar la actividad agonista/antagonista de los diversos anticuerpos anti-TweakR descritos aquí, se puede usar un ensayo de liberación de IL-8 (véanse, por ejemplo, las figuras 8A-8E y el Ejemplo 2). Usando los datos generados a partir de un ensayo de IL-8, se puede calcular el porcentaje de actividad agonista usando la fórmula: % de actividad agonista = $(a - c)/(b - c)$. El porcentaje de actividad antagonista se puede calcular usando la fórmula: % de antagonista = $(b - d)/(b - a)$; en la que a = cantidad de IL8 liberada de células tratadas con anticuerpo a 1,0 µg/ml, b = cantidad de IL8 liberada de células tratadas con TWEAK a 300 ng/ml, c = cantidad de IL8 liberada de células no tratadas, y d = cantidad de IL8 liberada de células tratadas con TWEAK a 300 ng/ml y anticuerpo a 10 µg/ml.

Las figuras 8A-8E representan ejemplos ilustrativos de liberación de IL-8 usando los anticuerpos anti-TweakR PDL192 (figura 8B), 18.3.3 (figura 8C), 136.1 (figura 8D), PDL400 (figura 8E), así como los anticuerpos anti-TweakR previamente identificados, ITEM1, ITEM2, ITEM3, e ITEM4 (figura 8A; Nakayama, *et al.*, 2003, Biochem Biophys Res Comm, 306:819-825). Basándose en los resultados de dos o más experimentos, ITEM1 muestra aproximadamente 25% de actividad agonista, ITEM2 muestra aproximadamente 2,8% de actividad agonista, ITEM3 muestra aproximadamente 37% de actividad agonista, ITEM4 muestra aproximadamente 12% de actividad agonista, PDL192 muestra aproximadamente 25% de actividad agonista, 19.2.1 muestra aproximadamente 39% de actividad agonista, 18.3.3 muestra aproximadamente 14% de actividad agonista, 136.1 muestra aproximadamente 278% de actividad agonista, y PDL400 muestra aproximadamente 8% de actividad agonista.

En algunas formas de realización, los anticuerpos anti-TweakR inducen apoptosis en células que expresan TweakR. Los ensayos para la apoptosis se pueden llevar a cabo mediante ensayo de marcado del extremo de muestra con digoxigenina-11-dUTP mediado por desoxinucleotidil transferasa terminal (TUNEL) (Lazebnik *et al.*, Nature: 371, 346 (1994)). Por ejemplo, como se ilustra en las figuras 10A-10B, los anticuerpos anti-TweakR son capaces de inhibir el crecimiento de células tumorales vía la inducción de apoptosis. En los ejemplos ilustrativos proporcionados en figuras 10A-10B, se postula que la inducción de apoptosis se produce a través de la activación de caspasa.

En algunas formas de realización, los anticuerpos anti-TweakR estimulan la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) en células que expresan TweakR. Típicamente, los anticuerpos anti-TweakR se unen a antígenos sobre la superficie de células diana (células que expresan TweakR) en presencia de células efectoras (tales como células asesinas naturales o macrófagos). Los receptores Fc sobre células efectoras reconocen anticuerpos unidos. La reticulación de los receptores Fc indica a las células efectoras que exterminen a las células diana mediante citolisis o apoptosis. La citolisis se puede detectar vía detección de la liberación de marcador o de lactato deshidrogenasa a partir de células lisadas. La citotoxicidad se puede detectar directamente mediante kits de detección conocidos en la técnica, tal como el Kit de Detección de Citotoxicidad de Roche Applied Science (Indianápolis, IN).

La actividad ADCC asociada a anticuerpos se puede monitorizar y cuantificar a través de la medida de la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) en el sobrenadante, que se libera rápidamente al dañar la membrana plasmática. Para determinar el porcentaje de citotoxicidad mediada por células, se calcula la absorbancia media de una muestra y se restan los controles de fondo usando la siguiente ecuación:

$$\text{Citotoxicidad(\%)} = \frac{\text{liberación de LDH}_{\text{muestra}} - \text{SR}_{\text{efectora}} - \text{SR}_{\text{diana}}}{\text{MR}_{\text{diana}} - \text{SR}_{\text{diana}}} \times 100$$

SR se refiere a liberación espontánea, y MR se refiere a liberación máxima. Véanse también los métodos descritos en la Publicación de Solicitud de Patente US nº 2005/0025763, que se incorpora aquí en su totalidad.

En algunas formas de realización, los anticuerpos anti-Tweak R inducen al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, u 80% de citotoxicidad de las células diana. Los anticuerpos anti-TweakR descritos aquí pueden tener una cualquiera de las actividades agonistas y/o antagonistas definidas, y una cualquiera de las citotoxicidades definidas.

En los ejemplos ilustrativos proporcionados en las figuras 20A-20C, el anticuerpo anti-TweakR, PDL192 induce actividad ADCC en células renales SN12C, así como estirpes celulares de transfectantes TweakR usando células mononucleares de sangre periférica humana o esplenocitos de ratón como células efectoras. La inducción de ADCC por anticuerpos anti-TweakR no se observó en células que no expresaron TweakR (datos no mostrados).

Las rutas biológicas asociadas con la muerte de células tumorales *in vivo* incluyen apoptosis y citolisis de células vía ADCC. Las contribuciones de la apoptosis y ADCC a la actividad antitumoral de anticuerpos anti-TweakR se midió *in vivo* usando dos anticuerpos murinos anti-TweakR con diferentes actividades ADCC *in vitro* (datos no mostrados). 19.2.1 anti-TweakR murino, un anticuerpo IgG2a que muestra una fuerte actividad ADCC *in vitro*, tuvo una actividad antitumoral significativa en el modelo de xenoinjerto renal SN12C (figura 21A) y en el modelo de xenoinjerto de melanoma A375 (figura 21B). El anticuerpo anti-TweakR murino 19.2.1xG1, que muestra actividad ADCC débil *in vitro*, tuvo actividad antitumoral insignificante en el modelo de xenoinjerto renal SN12C (figura 21A), y actividad antitumoral comparable a 19.2.1 en el modelo de xenoinjerto de melanoma A375 (figura 21B). En consecuencia, los anticuerpos anti-TweakR descritos aquí son capaces de reducir o inhibir el crecimiento de células tumorales vía la inducción de una o más rutas biológicas asociadas con el exterminio de células cancerosas *in vivo*.

Los anticuerpos útiles en las composiciones y métodos descritos aquí incluyen anticuerpos anti-TweakR que se unen específicamente al mismo epítipo o epítopos que PDL192, 18.3.3, o 136.1. El epítipo unido mediante los anticuerpos descritos aquí puede ser el mismo, solapante, o distinto. Por ejemplo, la unión específica de PDL192 y 19.2.1 a la proteína TweakR humana se elimina cambiando un único aminoácido en la posición 56, es decir, R56P, de su secuencia de aminoácidos (SEC ID n°:2; véanse las figuras 22A y 22B). Cuando R56 se cambia a P56, los anticuerpos anti-TweakR 18.3.3, ITEM1 e ITEM3 todavía son capaces de unirse a la secuencia de TweakR humana (véase, por ejemplo, figura 22A). Además, los anticuerpos anti-TweakR 18.3.3, ITEM1, e ITEM3 se unen a la proteína TweakR de ratón, que comprende una prolina en la posición 56 de su secuencia de aminoácidos. Sin embargo, los anticuerpos anti-TweakR PDL192 y 19.2.1 no se unen a la proteína TweakR de ratón (véanse, por ejemplo, las figuras 22A-22B). Estos resultados sugieren que PDL192 y 19.2.1 se unen a un epítipo que es distinto del epítipo unido mediante 18.3.3, ITEM1, e ITEM3.

Otros anticuerpos útiles en las composiciones y métodos descritos aquí incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos anti-TweakR que comprenden una región variable, al menos una región de entramado, o al menos una secuencia de aminoácidos de CDR que comparte una identidad del 100% con, o que es sustancialmente idéntica a, aquellas seleccionadas del grupo de SEC ID n°: 3-119. La extensión de las regiones variables, regiones de entramado y CDR son bien conocidas por los expertos normales en la técnica (véase, por ejemplo, Kabat, *et al.*, "Sequences of Proteins of Immunological Interest", 5ª ed., National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)).

Como se describe aquí, los anticuerpos anti-TweakR capaces de unirse específicamente a TweakR pueden comprender diversas combinaciones de CDR de cadena pesada y/o cadena ligera, y/o regiones de entramado. En algunas formas de realización, los anticuerpos anti-TweakR comprenden una región variable de cadena pesada y/o de cadena ligera. Los anticuerpos anti-TweakR de la invención comprenden las tres CDR de las regiones variables de la cadena pesada y ligera. En otras formas de realización, los anticuerpos anti-TweakR descritos aquí comprenden una, dos, tres, o las cuatro regiones de entramado. En otras formas de realización, los anticuerpos anti-TweakR comprenden CDR de ambas regiones variables de cadena pesada y de cadena ligera. En otras formas de realización, los anticuerpos anti-TweakR comprenden CDR y regiones de entramado de las regiones variables tanto de la cadena pesada como de la cadena ligera. Como es manifiesto a partir de la descripción anterior, los anticuerpos anti-TweakR útiles en las composiciones y métodos descritos aquí pueden comprender cualquier combinación de CDR y regiones de entramado, con la condición de que los anticuerpos resultantes sean capaces de unirse específicamente a TweakR y exterminar células cancerosas. Los anticuerpos anti-TweakR pueden ser monoclonales, quiméricos, humanizados, o completamente humanos.

En algunas formas de realización, los anticuerpos anti-TweakR comprenden CDR de una región variable de cadena pesada y ligera que comprenden secuencias de consenso que consisten en SEC ID n°: 120-122 y 127-129 y diversas combinaciones de una o más regiones de entramado de una región variable de cadena pesada y/o ligera que comprenden una secuencia de consenso seleccionada del grupo que consiste en SEC ID n°: 123-126 y SEC ID n°: 130-133.

Por ejemplo, un anticuerpo anti-TweakR o un fragmento de unión a antígeno del mismo, se puede seleccionar del grupo que consiste en: una CDR1 de cadena pesada codificada por una secuencia de aminoácidos que comprende la fórmula XaaYwmXaa (SEC ID n° 120), en la que Xaa en la posición 1 es S, N, o K, y Xaa en la posición 5 es S o N; una CDR2 de cadena pesada codificada por una secuencia de aminoácidos que comprende la fórmula EIRLKSDNYATHYAESXaaKG (SEC ID n° 121), en la que Xaa en la posición 17 es A o V; una CDR3 de cadena pesada codificada por una secuencia de aminoácidos que comprende la fórmula XaaXaaADXaaXaaDY (SEC ID n° 122), en la que Xaa en la posición 1 es G, T, o Y, Xaa en la posición 2 es F o Y, Xaa en la posición 5 es A, T, o Y, y Xaa en la posición 6 es F o M; una CDR1 de cadena ligera codificada por una secuencia de aminoácidos que comprende la fórmula XaaASQSVSTXaaYSYMXaa (SEC ID n° 127), en la que Xaa en la posición 1 es R o K, Xaa en la posición 10 es S o T y Xaa en la posición 15 es H o Q; una CDR2 de cadena ligera codificada por una secuencia de aminoácidos que comprende la fórmula YAXaaXaaLXaaS (SEC ID n° 128), en la que Xaa en la posición 3 es S o T, Xaa en la posición 4 es N o K, Xaa en la posición 6 es E o D; una CDR3 de cadena ligera codificada por una secuencia de aminoácidos que comprende la fórmula QHSWEXaaPYT (SEC ID n° 129), en la que Xaa en la posición 6 es I o L; una FR1 de cadena pesada codificada por una secuencia de aminoácidos que comprende la fórmula EVXaaLXaaESGGGLVQPGGSXaaXaaLSCXaaASGFXaaFXaa (SEC ID n° 123), en la que Xaa en la posición 3 es Q o K, en la que Xaa en la posición 5 es E, V o G, Xaa en la posición 18 es L o M, Xaa en la posición 19 es R o K, Xaa en la posición 23 es A o V, Xaa en la posición 28 es T o P, y Xaa en la posición 30 es S, N o T; una FR2 de cadena pesada codificada por una secuencia de aminoácidos que comprende la fórmula WVRQXaaPXaaKGLEWXaaA (SEC ID n° 124), en la que Xaa en la posición 5 es A o S, Xaa en la posición 7 es E o G, Xaa en la posición 13 es V o L; una FR3 de cadena pesada codificada por una secuencia de aminoácidos que comprende la fórmula XaaFTISRDXXaaXaaXaaXaaXaaYLQMNXaaLRAEXaaTXaaXaaYYCXaaXaa (SEC ID n° 125), en la que Xaa en la posición 1 es R o K, Xaa en la posición 8 es D o N, Xaa en la posición 9 es S o A, Xaa en la posición 10 es K o R, Xaa en la posición 11 es N o S, Xaa en la posición 12 es S, R, o T, Xaa en la posición 13 es L o V, Xaa en la posición 19 es S o N, Xaa en la posición 24 es D o N, Xaa en la posición 26 es A o G, Xaa en la posición 27 es I o V, Xaa en la posición 31 es T, S o A, y Xaa en la posición 32 es G, P, o R; una FR4 de cadena pesada codificada por una secuencia de aminoácidos que comprende la fórmula WGQGTXXaaXaaTVSS (SEC ID n°

126), en la que Xaa en la posición 6 es L, S o T, y Xaa en la posición 7 es V o L; una FR1 de cadena ligera codificada por una secuencia de aminoácidos que comprende la fórmula XaaIXaaXaaTQSPXaaSLXaaXaaSXaaGXaaRXaaTIXaaC (SEC ID nº 130), en la que Xaa en la posición 1 es D o E, Xaa en la posición 3 es Q o V, Xaa en la posición 4 es M o L, Xaa en la posición 9 es G, S o A, Xaa en la posición 12 es S, A o T, Xaa en la posición 13 es A, L, o V, Xaa en la posición 15 es P, V, o L, Xaa en la posición 17 es D, E, o Q, Xaa en la posición 19 es V o A, y Xaa en la posición 22 es T o S; una FR2 de cadena ligera codificada por una secuencia de aminoácidos que comprende la fórmula WYQQXaaPGXaaXaaPKLLIK (SEC ID nº 131), en la que Xaa en la posición 5 es R o K, Xaa en la posición 8 es K o Q, y Xaa en la posición 9 es A, P o S; una FR3 de cadena ligera codificada por una secuencia de aminoácidos que comprende la fórmula GXaaPXaaRFSGSGSGTDFTLXaaIXaaXaaXaaXaaXaaEDXaaAXaaYYC (SEC ID nº 132), en la que Xaa en la posición 2 es V o I, Xaa en la posición 4 es S, D, o A, Xaa en la posición 18 es T o N, Xaa en la posición 20 es S o H, Xaa en la posición 21 es S, R, o P, Xaa en la posición 22 es L o V, Xaa en la posición 23 es Q o E, Xaa en la posición 24 es P o E, Xaa en la posición 27 es F, T o A y Xaa en la posición 29 es T o V; y/o una FR4 de cadena ligera codificada por una secuencia de aminoácidos que comprende la fórmula FGXaaGTXaaXaaEIKR (SEC ID nº 133), en la que Xaa en la posición 3 es G o Q, Xaa en la posición 6 es K o R, y Xaa en la posición 7 es V o L.

A título de otro ejemplo, un anticuerpo anti-TweakR puede comprender una CDR1 de cadena pesada codificada por una secuencia de aminoácidos que comprende la fórmula XaaYWMXaa (SEC ID nº 120), en la que Xaa en la posición 1 es S, N, o K y Xaa en la posición 5 es S o N, una CDR2 de cadena pesada codificada por una secuencia de aminoácidos que comprende la fórmula EIRLKSDNYATHYAESXaaKG (SEC ID nº 121), en la que Xaa en la posición 17 es A o V; y, una CDR3 de cadena pesada codificada por una secuencia de aminoácidos que comprende la fórmula XaaXaaADXaaXaaDY (SEC ID nº 122), en la que Xaa en la posición 1 es G, T, o Y, Xaa en la posición 2 es F o Y, Xaa en la posición 5 es A, T, o Y, y Xaa en la posición 6 es F o M.

A título de otro ejemplo, un anticuerpo anti-TweakR puede comprender una CDR1 de cadena ligera codificada por una secuencia de aminoácidos que comprende la fórmula XaaASQSVSTXaaYSYMXaa (SEC ID nº 127), en la que Xaa en la posición 1 es R o K, Xaa en la posición 10 es S o T y Xaa en la posición 15 es H o Q, una CDR2 de cadena ligera codificada por una secuencia de aminoácidos que comprende la fórmula YAXaaXaaLXaaS (SEC ID nº 128), en la que Xaa en la posición 3 es S o T, Xaa en la posición 4 es N o K, Xaa en la posición 6 es E o D, y, una CDR3 de cadena ligera codificada por una secuencia de aminoácidos que comprende la fórmula QHSWEXaaPYT (SEC ID nº 129), en la que Xaa en la posición 6 es I o L.

En todavía otras formas de realización, un anticuerpo anti-TweakR puede comprender una CDR1 de cadena pesada codificada por una secuencia de aminoácidos que comprende la fórmula XaaYWMXaa (SEC ID nº 120), en la que Xaa en la posición 1 es S, N, o K y Xaa en la posición 5 es S o N, una CDR2 de cadena pesada codificada por una secuencia de aminoácidos que comprende la fórmula EIRLKSDNYATHYAESXaaKG (SEC ID nº 121), en la que Xaa en la posición 17 es A o V; una CDR3 de cadena pesada codificada por una secuencia de aminoácidos que comprende la fórmula XaaXaaADXaaXaaDY (SEC ID nº 122), en la que Xaa en la posición 1 es G, T, o Y, Xaa en la posición 2 es F o Y, Xaa en la posición 5 es A, T, o Y, y Xaa en la posición 6 es F o M, una CDR1 de cadena ligera codificada por una secuencia de aminoácidos que comprende la fórmula XaaASQSVSTXaaYSYMXaa (SEC ID nº 127), en la que Xaa en la posición 1 es R o K, Xaa en la posición 10 es S o T y Xaa en la posición 15 es H o Q, una CDR2 de cadena ligera codificada por una secuencia de aminoácidos que comprende la fórmula YAXaaXaaLXaaS (SEC ID nº 128), en la que Xaa en la posición 3 es S o T, Xaa en la posición 4 es N o K, Xaa en la posición 6 es E o D, y, una CDR3 de cadena ligera codificada por una secuencia de aminoácidos que comprende la fórmula QHSWEXaaPYT (SEC ID nº 129), en la que Xaa en la posición 6 es I o L. Además de las formas de realización descritas para las CDR de las cadenas pesada y/o ligera, los anticuerpos anti-TweakR pueden comprender otras combinaciones de CDR de cadenas pesadas y/o ligeras, con la condición de que los anticuerpos resultantes sean capaces de unirse específicamente a TweakR y exterminar células cancerosas.

En otras formas de realización, un anticuerpo anti-TweakR puede comprender una CDR1 de cadena pesada codificada por una secuencia de aminoácidos que comprende la fórmula XaaYWMXaa (SEC ID nº 120), en la que Xaa en la posición 1 es S, N, o K y Xaa en la posición 5 es S o N, una CDR2 de cadena pesada codificada por una secuencia de aminoácidos que comprende la fórmula EIRLKSDNYATHYAESXaaKG (SEC ID nº 121), en la que Xaa en la posición 17 es A o V; una CDR3 de cadena pesada codificada por una secuencia de aminoácidos que comprende la fórmula XaaXaaADXaaXaaDY (SEC ID nº 122), en la que Xaa en la posición 1 es G, T, o Y, Xaa en la posición 2 es F o Y, Xaa en la posición 5 es A, T, o Y, y Xaa en la posición 6 es F o M, una CDR1 de cadena ligera codificada por una secuencia de aminoácidos que comprende la fórmula XaaASQSVSTXaaYSYMXaa (SEC ID nº 127), en la que Xaa en la posición 1 es R o K, Xaa en la posición 10 es S o T y Xaa en la posición 15 es H o Q, una CDR2 de cadena ligera codificada por una secuencia de aminoácidos que comprende la fórmula YAXaaXaaLXaaS (SEC ID nº 128), en la que Xaa en la posición 3 es S o T, Xaa en la posición 4 es N o K, Xaa en la posición 6 es E o D, una CDR3 de cadena ligera codificada por una secuencia de aminoácidos que comprende la fórmula QHSWEXaaPYT (SEC ID nº 129), en la que Xaa en la posición 6 es I o L, una FR1 de cadena pesada codificada por una secuencia de aminoácidos que comprende la fórmula EVXaaLXaaESGGGLVQPGGSXaaXaaLSCXaaASGFXaaFXaa (SEC ID nº 123), en la que Xaa en la posición 3 es Q o K, en la que Xaa en la posición 5 es E, V o G, Xaa en la posición 18 es L o M, Xaa en la posición 19 es R o K, Xaa en la posición 23 es A o V, Xaa en la posición 28 es T o P, y Xaa en la posición 30 es S, N o T, una FR2 de cadena

pesada codificada por una secuencia de aminoácidos que comprende la fórmula WVRQXaaPXaaKGLEWXaaA (SEC ID nº 124), en la que Xaa en la posición 5 es A o S, Xaa en la posición 7 es E o G, Xaa en la posición 13 es V o L, una FR3 de cadena pesada codificada por una secuencia de aminoácidos que comprende la fórmula XaaFTISRDXXaaXaaXaaXaaXaaXaaYLQMNXXaaLRAEXaaTXaaXaaYYCXaaXaa (SEC ID nº 125), en la que Xaa en la posición 1 es R o K, Xaa en la posición 8 es D o N, Xaa en la posición 9 es S o A, Xaa en la posición 10 es K o R, Xaa en la posición 11 es N o S, Xaa en la posición 12 es S, R, o T, Xaa en la posición 13 es L o V, Xaa en la posición 19 es S o N, Xaa en la posición 24 es D o N, Xaa en la posición 26 es A o G, Xaa en la posición 27 es I o V, Xaa en la posición 31 es T, S o A, y Xaa en la posición 32 es G, P, o R, y una FR4 de cadena pesada codificada por una secuencia de aminoácidos que comprende la fórmula WGQGTXXaaXaaTVSS (SEC ID nº 126), en la que Xaa en la posición 6 es L, S o T y Xaa en la posición 7 es V o L.

A título de otro ejemplo, un anticuerpo anti-TweakR puede comprender una CDR1 de cadena pesada codificada por una secuencia de aminoácidos que comprende la fórmula XaaYWMXaa (SEC ID nº 120), en la que Xaa en la posición 1 es S, N, o K y Xaa en la posición 5 es S o N, una CDR2 de cadena pesada codificada por una secuencia de aminoácidos que comprende la fórmula EIRLKSDNYATHYAESXaaKG (SEC ID nº 121), en la que Xaa en la posición 17 es A o V; una CDR3 de cadena pesada codificada por una secuencia de aminoácidos que comprende la fórmula XaaXaaADXaaXaaDY (SEC ID nº 122), en la que Xaa en la posición 1 es G, T, o Y, Xaa en la posición 2 es F o Y, Xaa en la posición 5 es A, T, o Y, y Xaa en la posición 6 es F o M, una CDR1 de cadena ligera codificada por una secuencia de aminoácidos que comprende la fórmula XaaASQSVSTXaaYSYMXaa (SEC ID nº 127), en la que Xaa en la posición es 1 es R o K, Xaa en la posición 10 es S o T y Xaa en la posición 15 es H o Q, una CDR2 de cadena ligera codificada por una secuencia de aminoácidos que comprende la fórmula YAXaaXaaLXaaS (SEC ID nº 128), en la que Xaa en la posición 3 es S o T, Xaa en la posición 4 es N o K, Xaa en la posición 6 es E o D, una CDR3 de cadena ligera codificada por una secuencia de aminoácidos que comprende la fórmula QHSWEXaaPYT (SEC ID nº 129), en la que Xaa en la posición 6 es I o L, una FR1 de cadena pesada codificada por una secuencia de aminoácidos que comprende la fórmula EVXaaLXaaESGGGLVQPGGSXaaXaaLSCXaaASGFXaaFXaa (SEC ID nº 123), en la que Xaa en la posición 3 es Q o K, en la que Xaa en la posición 5 es E, V o G, Xaa en la posición 18 es L o M, Xaa en la posición 19 es R o K, Xaa en la posición 23 es A o V, Xaa en la posición 28 es T o P, y Xaa en la posición 30 es S, N o T, una FR2 de cadena pesada codificada por una secuencia de aminoácidos que comprende la fórmula WVRQXaaPXaaKGLEWXaaA (SEC ID nº 124), en la que Xaa en la posición 5 es A o S, Xaa en la posición 7 es E o G, Xaa en la posición 13 es V o L, una FR3 de cadena pesada codificada por una secuencia de aminoácidos que comprende la fórmula XaaFTISRDXXaaXaaXaaXaaXaaXaaYLQMNXXaaLRAEXaaTXaaXaaYYCXaaXaa (SEC ID nº 125), en la que Xaa en la posición 1 es R o K, Xaa en la posición 8 es D o N, Xaa en la posición 9 es S o A, Xaa en la posición 10 es K o R, Xaa en la posición 11 es N o S, Xaa en la posición 12 es S, R, o T, Xaa en la posición 13 es L o V, Xaa en la posición 19 es S o N, Xaa en la posición 24 es D o N, Xaa en la posición 26 es A o G, Xaa en la posición 27 es I o V, Xaa en la posición 31 es T, S o A, y Xaa en la posición 32 es G, P, o R, una FR4 de cadena pesada codificada por una secuencia de aminoácidos que comprende la fórmula WGQGTXXaaXaaTVSS (SEC ID nº 126), en la que Xaa en la posición 6 es L, S o T y Xaa en la posición 7 es V o L, una FR1 de cadena ligera codificada por una secuencia de aminoácidos que comprende la fórmula XaaIXaaXaaTQSPXaaSLXaaXaaSXaaGXaaRXaaTIXaaC (SEC ID nº 130), en la que Xaa en la posición 1 es D o E, Xaa en la posición es 3 es Q o V, Xaa en la posición 4 es M o L, Xaa en la posición 9 es G, S o A, Xaa en la posición 12 es S, A o T, Xaa en la posición 13 es A, L, o V, Xaa en la posición 15 es P, V, o L, Xaa en la posición 17 es D, E, o Q, Xaa en la posición 19 es V o A, y Xaa en la posición 22 es T o S, una FR2 de cadena ligera codificada por una secuencia de aminoácidos que comprende la fórmula WYQQXaaPGXaaXaaPKLLIK (SEC ID nº 131), en la que Xaa en la posición 5 es R o K, Xaa en la posición 8 es K o Q, y Xaa en la posición 9 es A, P o S, una FR3 de cadena ligera codificada por una secuencia de aminoácidos que comprende la fórmula GXaaPXaaRFSGSGSGTDFTLXaaIXaaXaaXaaXaaXaaEDXaaAXaaYYC (SEC ID nº 132), en la que Xaa en la posición 2 es V o I, Xaa en la posición 4 es S, D, o A, Xaa en la posición 13 es T o N, Xaa en la posición 20 es S o H, Xaa en la posición 21 es S, R, o P, Xaa en la posición 22 es L o V, Xaa en la posición 23 es Q o E, Xaa en la posición 24 es P o E, Xaa en la posición 27 es F, T o A y Xaa en la posición 29 es T o V, y una FR4 de cadena ligera codificada por una secuencia de aminoácidos que comprende la fórmula FGXaaGTXXaaXaaEIKR (SEC ID nº 133), en la que Xaa en la posición 3 es G o Q, Xaa en la posición 6 es K o R, y Xaa en la posición 7 es V o L.

Además de comprender diversas combinaciones de secuencias de consenso para las CDR de cadena pesada y/o de cadena ligera y para las regiones de entramado descritas anteriormente, los anticuerpos anti-TweakR descritos aquí pueden comprender diversas combinaciones de CDR de cadena pesada y/o cadena ligera y regiones de entramado seleccionadas del grupo que consiste en SEC ID nº: 13, 19, 25, 66, 72, 78, 31, 40, 49, 58, 84, 93, 102 y 111.

A título de ejemplo y no de limitación, un anticuerpo anti-TweakR puede comprender una CDR1 de cadena pesada codificada por la secuencia de aminoácidos que comprende SYWMS (SEC ID nº: 13), una CDR2 de cadena pesada codificada por la secuencia de aminoácidos que comprende EIRLKSDNYATHYAESVKG (SEC ID nº: 19), y una CDR3 de cadena pesada codificada por la secuencia de aminoácidos que comprende la fórmula YYADAMDY (SEC ID nº: 25).

65

A título de otro ejemplo, un anticuerpo anti-TweakR puede comprender una CDR1 de cadena ligera codificada por la secuencia de aminoácidos que comprende RASQSVSVTSSYSYMH (SEC ID nº 66), una CDR2 de cadena ligera codificada por la secuencia de aminoácidos que comprende YASNLR (SEC ID nº 72), y una CDR3 de cadena ligera codificada por la secuencia de aminoácidos que comprende la fórmula QHSWEIPYT (SEC ID nº 78).

5 Un anticuerpo anti-TweakR de la invención comprende las tres CDR tanto de la cadena pesada como de la cadena ligera, por ejemplo una CDR1 de cadena pesada codificada por la secuencia de aminoácidos que comprende SYWMS (SEC ID nº: 13), una CDR2 de cadena pesada codificada por la secuencia de aminoácidos que comprende EIRLKSDNYATHYAESVKG (SEC ID nº: 19), una CDR3 de cadena pesada codificada por la secuencia de aminoácidos que comprende la fórmula YYADAMDY (SEC ID nº: 25), una CDR1 de cadena ligera codificada por la secuencia de aminoácidos que comprende RASQSVSTSSYSYMH (SEC ID nº 66), una CDR2 de cadena ligera codificada por la secuencia de aminoácidos que comprende YASNLES (SEC ID nº 72), y una CDR3 de cadena ligera codificada por la secuencia de aminoácidos que comprende la fórmula QHSWEIPYT (SEC ID nº 78). Además de las formas de realización descritas para las CDR de cadena pesada y/o de cadena ligera, los anticuerpos anti-TweakR pueden comprender otras combinaciones de CDR de cadena pesada y/o de cadena ligera, con la condición de que los anticuerpos resultantes sean capaces de unirse a TweakR y exterminar células cancerosas.

20 A título de otro ejemplo, un anticuerpo anti-TweakR puede comprender una FR1 de cadena pesada codificada por la secuencia de aminoácidos que comprende EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS (SEC ID nº 31), una FR2 de cadena pesada codificada por la secuencia de aminoácidos que comprende WVRQAPGKGLEWVA (SEC ID nº 40), una FR3 de cadena pesada codificada por la secuencia de aminoácidos que comprende RFTISRDDSKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCTG (SEC ID nº 49), y una FR4 de cadena pesada codificada por la secuencia de aminoácidos que comprende WGQGTLVTVSS (SEC ID nº 58). Como se apreciará por los expertos en la técnica, además de las regiones de entramado de cadena pesada codificadas por SEC ID Nos: 31, 40, 49, y 58, los anticuerpos anti-TweakR descritos aquí pueden comprender una o más secuencias de CDR de cadena pesada, por ejemplo SEC ID nº: 13, 19 y 25 y/o una o más secuencias de CDR de cadena ligera, por ejemplo SEC ID nº: 66, 72, y 78. Además de las formas de realización descritas para las CDR de cadena pesada y/o de cadena ligera, con la condición de que los anticuerpos resultantes sean capaces de unirse a TweakR y exterminar células cancerosas.

30 A título de otro ejemplo, un anticuerpo anti-TweakR puede comprender una FR1 de cadena ligera codificada por la secuencia de aminoácidos que comprende DIQMTQSPSSLSASVGRVTITC (SEC ID nº 84), una FR2 de cadena ligera codificada por la secuencia de aminoácidos que comprende WYQQKPGKGLAPKLLIK (SEC ID nº 93), una FR3 de cadena ligera codificada por la secuencia de aminoácidos que comprende GVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYC (SEC ID nº 102), y una FR4 de cadena ligera codificada por la secuencia de aminoácidos que comprende FGGGTKVEIKR (SEC ID nº 111). Como se apreciará por los expertos en la técnica, además de las regiones de entramado de cadena ligera codificadas por SEC ID Nos: 84, 93, 102, y 111, los anticuerpos anti-TweakR descritos aquí pueden comprender una o más secuencias de CDR de cadena pesada, por ejemplo SEC ID nº: 13, 19 y 25 y/o una o más secuencias de CDR de cadena ligera, por ejemplo SEC ID nº: 66, 72, y 78, y/o una o más regiones de entramado de cadena pesada codificadas por SEC ID Nos: 31, 40, 49 y 58. De este modo, los anticuerpos anti-TweakR pueden comprender otras combinaciones de CDR y regiones de entramado de cadena pesada y/o de cadena ligera, con la condición de que los anticuerpos resultantes sean capaces de unirse a TweakR y exterminar células cancerosas.

45 Una región de entramado constante, variable, "sustancialmente idéntica", o CDR, se refiere a una región de anticuerpo en la que al menos alrededor de 85-90%, y preferiblemente al menos 95% de la secuencia de aminoácidos es idéntica a una región variable o constante de anticuerpo natural o sin alterar. Los términos "idéntica" o porcentaje de "identidad", en el contexto de dos o más secuencias de aminoácidos o nucleotídicas, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son las mismas o tienen un porcentaje específico de restos de aminoácidos o nucleótidos que son los mismos (es decir, alrededor de 60% de identidad, preferiblemente 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o mayor identidad a lo largo de una región especificada, cuando se comparan y alinean en busca de la máxima correspondencia a lo largo de una ventana de comparación o región designada), según se mide usando algoritmos de comparación de secuencias BLAST o BLAST 2.0 con los parámetros por defecto descritos más abajo, o mediante alineamiento manual e inspección visual (véase, por ejemplo, la descripción de BLAST en el sitio web del National Center for Biotechnology Information (NCBI) en www.ncbi.nlm.nih.gov).

60 Las secuencias idénticas o sustancialmente idénticas incluyen secuencias que tienen supresiones y/o adiciones, así como aquellas que tienen sustituciones, así como variantes de origen natural, por ejemplo polimórficas o alélicas, y variantes obtenidas por el hombre, tales como variantes modificadas de forma conservativa. Los algoritmos bien conocidos para medir la identidad de secuencias pueden dar cuenta de saltos y similares. Preferiblemente, existe identidad de secuencia a lo largo de una región que tiene al menos alrededor de 25 aminoácidos o nucleótidos de longitud, o más preferiblemente a lo largo de una región que tiene 50-100 aminoácidos o nucleótidos de longitud.

65 Las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos anti-TweakR útiles en los métodos descritos aquí no están confinadas a las secuencias encontradas en anticuerpos naturales; los anticuerpos se pueden rediseñar para obtener características deseadas usando técnicas de ADN recombinante bien conocidas. Tales "anticuerpos

genéticamente alterados” incluyen aquellos en los que la secuencias de aminoácidos se ha variado con respecto a aquella de un anticuerpo progenitor (es decir, sin alterar). Las posibles variaciones oscilan desde cambiar sólo uno o unos pocos aminoácidos hasta el rediseño completo de, por ejemplo, la región variable o constante. Se pueden hacer cambios, mediante mutación dirigida al sitio, en la región constante a fin de mejorar o alterar las características funcionales de un anticuerpo terapéutico, tales como inmunogenicidad, características farmacocinéticas (por ejemplo, semivida sérica), fijación del complemento, interacción con membranas y otras funciones efectoras. Generalmente, se pueden hacer cambios a la región variable del anticuerpo a fin de mejorar las características de unión al antígeno.

Los ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos anti-TweakR y las secuencias de aminoácidos descritas aquí, así como moléculas que se hibridan a dichas secuencias de ácidos nucleicos y que codifican anticuerpos anti-TweakR, teniendo tales anticuerpos las propiedades funcionales descritas aquí, se pueden usar en los métodos descritos aquí.

Los anticuerpos anti-TweakR pueden ser de cualquiera de los isotipos reconocidos. En algunas formas de realización, los anticuerpos anti-TweakR son uno de los cuatro isotipos IgG humanos, es decir, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, o uno de los cuatro isotipos de IgG de ratón, es decir, IgG1 murino, IgG2a murino, IgG2b murino, o IgG3 murino. En otras formas de realización, los anticuerpos anti-TweakR son del isotipo IgG1 humano.

En otra realización, los anticuerpos tienen bajos niveles de fucosa, o carecen de ella. Los anticuerpos que carecen de fucosa se han correlacionado con actividad ADCC (citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos) potenciada, especialmente a bajas dosis de anticuerpo. Shields, R.L., *et al.*, (2002) *J. Biol. Chem.* 277:26733-26740; Shinkawa, T. *et al.*, (2003), *J. Biol. Chem.* 278:3466. Los métodos para preparar anticuerpos con menos fucosa incluyen el crecimiento en células YB2/0 de mieloma de rata (ATCC CRL 1662). Las células YB2/0 expresan niveles bajos de ARNm FUT8, que codifica una enzima (α 1,6-fucosiltransferasa) necesaria para la fucosilación de polipéptidos.

Métodos alternativos para incrementar la actividad ADCC incluyen mutaciones en la porción Fc de un anticuerpo anti-TweakR, particularmente mutaciones que incrementan la afinidad del anticuerpo por un receptor Fc γ R. Usando ensayos a base de células de citotoxicidad seleccionados específicamente, se ha demostrado una correlación entre una mayor unión de Fc γ R con Fc mutado. Shields, R.L. *et al.* (2001) *J. Biol. Chem.* 276:6591-6604; Presta *et al.* (2002), *Biochem Soc. Trans.* 30:487-490. Otros métodos para incrementar la actividad ADCC incluyen la generación de mutaciones específicas de la región Fc, como se describe en la Publicación de Solicitud de Patente US nº 2005/0025763, cuya descripción se incorpora aquí en su totalidad.

Otros tipos de anticuerpos que se pueden usar en las composiciones y métodos descritos aquí incluyen, pero no se limitan a, cualquier molécula inmunoglobulínica que se une (por ejemplo, de forma inmunoespecífica, es decir, compite con la unión no específica, como se determina mediante inmunoensayos bien conocidos en la técnica para evaluar la unión específica de un anticuerpo a un antígeno) a un antígeno. Tales anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos policlonales, monoclonales, biespecíficos, multiespecíficos, humanos, humanizados, anticuerpos quiméricos, anticuerpos monocatenarios, fragmentos Fab, fragmentos F(ab')₂, Fvs enlazado mediante disulfuro, y fragmentos que contienen un dominio V_L o V_H, o incluso una región que determina la complementariedad (CDR) que se une específicamente a un antígeno, en ciertos casos manipulados mediante ingeniería para que contengan o se fusionen a un dominio de unión a Fc.

6.5 Detección de secuencias de TweakR para aplicaciones de diagnóstico

Los niveles de expresión de genes en tejido normal (por ejemplo, que no sufre un trastorno) y en tejido enfermo (y en algunos casos, para diversas gravedades de trastornos que se refieren al pronóstico, como se esquematiza más abajo) se evalúan para proporcionar perfiles de expresión. Un perfil de expresión génica de un estado celular particular o punto de desarrollo es esencialmente una “huella” del estado de la célula. Aunque dos estados pueden tener un gen particular expresado de forma similar, la evaluación de un número de genes simultáneamente permite la generación de un perfil de expresión génica que refleja el estado de la célula. Comparando los perfiles de expresión de células en diferentes estados, se obtiene información con respecto a qué genes son importantes (incluyendo tanto el aumento como la disminución de genes) en cada uno de estos estados. Después, se puede realizar o confirmar el diagnóstico para determinar si una muestra tisular tiene el perfil de expresión génica de tejido normal o enfermo. Esto proporcionará el diagnóstico molecular de afecciones relacionadas.

“Expresión diferencial”, o equivalentes gramaticales como se usan aquí, se refiere a diferencias cualitativas o cuantitativas en los patrones de expresión génica temporales y/o celulares en y entre células y tejidos. De este modo, un gen expresado diferencialmente puede tener cualitativamente su expresión alterada, incluyendo una activación o inactivación, por ejemplo en tejido normal frente a tejido enfermo. Los genes se pueden encender o apagar en un estado particular, con respecto a otro estado, permitiendo así la comparación de dos o más estados. Un gen cualitativamente regulado mostrará un patrón de expresión en un estado o tipo celular que es detectable mediante técnicas estándar. Algunos genes se expresarán en un estado o tipo celular, pero no en ambos. Como alternativa, la diferencia en la expresión puede ser cuantitativa, por ejemplo en cuanto a que la expresión está incrementada o disminuida, por ejemplo la expresión génica está aumentada, dando como resultado una mayor

cantidad de transcrito, o reducida, dando como resultado una menor cantidad de transcrito. El grado en el que difiere la expresión sólo necesita ser suficientemente grande para cuantificar vía técnicas de caracterización estándar como se esquematizan más abajo, tales como mediante el uso de ensayos de expresión de Affymetrix GENECHIP® (matriz de microchip de ADN). Véase, Lockhart (1996) *Nature Biotechnology* 14:1675-1680. Otras técnicas incluyen, pero no se limitan a, PCR con transcriptasa inversa cuantitativa, análisis northern, y protección de ARNasa. Como se esquematiza anteriormente, preferiblemente el cambio en la expresión (por ejemplo, aumento o disminución) es al menos alrededor de 50%, más preferiblemente al menos alrededor de 100%, más preferiblemente al menos alrededor de 150%, más preferiblemente al menos alrededor de 200%, siendo especialmente preferido de 300 a al menos 1000%.

La evaluación puede ser a nivel de transcrito génico o a nivel proteico. La cantidad de expresión génica se puede monitorizar usando sondas de ácido nucleico para el equivalente de ARN o ADN del transcrito génico, y la cuantificación de los niveles de expresión génica, o, como alternativa, el propio producto génico final (proteína, se puede monitorizar, por ejemplo, con anticuerpos contra la proteína TweakR e inmunoensayos estándar (ELISAs, etc.) u otras técnicas, incluyendo ensayos de espectroscopía de masas, ensayos de electroforesis en gel bidimensionales, etc. Las proteínas que corresponden a TweakR, por ejemplo las identificadas como importantes en un fenotipo de enfermedad, se pueden evaluar en un ensayo de diagnóstico de la enfermedad. La monitorización de la expresión génica se puede realizar simultáneamente en un número de genes. Igualmente, se puede realizar una monitorización múltiple de la expresión proteica.

En consecuencia, las sondas de ácidos nucleicos de TweakR se pueden unir a biochips para la detección y cuantificación de secuencias de TweakR en una célula particular. Los ensayos se describen adicionalmente más abajo en el ejemplo. Para proporcionar una mayor sensibilidad, se pueden usar técnicas de PCR.

Se pueden detectar ácidos nucleicos que codifican TweakR. Aunque se puede detectar ADN o ARN que codifica la proteína TweakR, son de particular interés los métodos en los que se detecta un ARNm que codifica una proteína TweakR. Las sondas para detectar ARNm pueden ser una sonda nucleotídica/desoxinucleotídica, que es complementaria a y se hibrida con el ARNm, e incluye, pero no se limita a, oligonucleótidos, ADNc, o ARN. Las sondas también deberían contener un marcador detectable, como se define aquí. En un método, el ARNm se detecta tras inmovilizar el ácido nucleico a examinar sobre un soporte sólido, tal como membranas de nailon, e hibridando la sonda con la muestra. Tras el lavado para eliminar la sonda no unida específicamente, se detecta el marcador. En otro método, la detección del ARNm se lleva a cabo *in situ*. En este método, se ponen en contacto células permeabilizadas o muestras de tejidos con una sonda de ácido nucleico marcada de forma detectable durante un tiempo suficiente para permitir que la sonda se hibride con el ARNm diana. Tras el lavado para eliminar la sonda no unida específicamente, se detecta el marcador. Por ejemplo, una ribosonda (sonda de ARN) marcada con digoxigenina, que es complementaria al ARNm que codifica una mielomaproteína, se detecta mediante la unión de la digoxigenina con un anticuerpo secundario anti-digoxigenina, y desarrollando con nitroazul de tetrazolio y fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolilo.

Las proteínas TweakR, los anticuerpos de la invención, los ácidos nucleicos, las proteínas modificadas, y las células que contienen secuencias de TweakR, se pueden usar en ensayos de diagnóstico. Estos ensayos se pueden llevar a cabo sobre un gen individual o a nivel polipeptídico correspondiente. Los perfiles de expresión se pueden usar, preferiblemente junto con técnicas de cribado de alto rendimiento, para permitir la monitorización de genes del perfil de expresión y/o polipéptidos correspondientes.

Como se describe y define aquí, la proteína TweakR encuentra uso como un marcador de enfermedad de afecciones cancerosas, incluyendo, pero sin limitarse a, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer pulmonar, melanoma, cáncer pancreático, cáncer de cabeza y cuello, cáncer ovárico, cáncer de estómago, cáncer uterino, cáncer cervical, cáncer esofágico, cáncer de células renales, glioblastoma, y sarcomas. Además, TweakR encuentra uso como un marcador con fines de pronóstico o de diagnóstico. La detección de estas proteínas en tejido enfermo putativo y/o células tumorales en circulación permite la detección, pronóstico, o diagnóstico de tales afecciones, y la selección de la estrategia terapéutica. Los anticuerpos de la invención se pueden usar para detectar TweakR. Un método preferido separa proteínas de una muestra mediante electroforesis sobre un gel (típicamente un gel proteico desnaturizante y reductor, pero puede ser cualquier otro tipo de gel, incluyendo geles de enfoque isoelectrico y similares). Tras la separación de las proteínas, se detecta TweakR, por ejemplo mediante inmunotransferencia con anticuerpos producidos contra TweakR.

En otro método, los anticuerpos contra TweakR encuentran uso en técnicas de formación de imágenes *in situ*, por ejemplo en histología. Véase, por ejemplo, Asai, *et al.* (eds. 1993) *Methods in Cell Biology: Antibodies in Cell Biology* (vol. 37) Academic Press. En este método, las células se ponen en contacto con uno a muchos anticuerpos contra la proteína o proteínas TweakR. Tras el lavado para eliminar la unión del anticuerpo no específica, se detecta la presencia del anticuerpo o anticuerpos. Un anticuerpo de la invención se puede detectar incubando con un anticuerpo secundario que contiene un marcador detectable. En otro método, el anticuerpo primario contra TweakR contiene un marcador detectable, por ejemplo un marcador enzimático que actúa sobre un sustrato. En otro método, cada uno de los múltiples anticuerpos primarios contiene un marcador distinto y detectable. Este método encuentra uso particular en el cribado simultáneo para TweakR junto con otros marcadores de las afecciones mencionadas

anteriormente. También se proporcionan mediante la invención muchas otras técnicas histológicas formadoras de imágenes.

5 En un método, el marcador se detecta en un fluorímetro que tiene la capacidad para detectar y distinguir emisiones de diferentes longitudes de onda. Además, en el método se puede usar un clasificador de células activado por fluorescencia (FACS).

10 En otra realización, los anticuerpos de la invención encuentran uso en el diagnóstico del cáncer a partir de muestras de sangre, suero, plasma, heces, u otras muestras. Los anticuerpos se pueden usar para detectar TweakR mediante técnicas de inmunoensayo previamente descritas, incluyendo ELISA, inmunotransferencia (transferencia Western), inmunoprecipitación, tecnología BIACORE y similares.

15 En otro método, se lleva a cabo la hibridación *in situ* de sondas de ácido nucleico de TweakR marcadas a matrices de tejidos. Por ejemplo, se obtienen matrices de muestras de tejido, incluyendo tejido enfermo y/o tejido normal. Entonces se lleva a cabo la hibridación *in situ* (véase, por ejemplo, Ausubel, más arriba). Cuando se comparan las huellas entre un individuo y un patrón, el diagnóstico, el pronóstico o la predicción se pueden basar en los hallazgos. Se entenderá además que los genes que indican el diagnóstico pueden diferir de aquellos que indican el pronóstico, y la obtención de un perfil molecular del estado de las células puede conducir a distinciones entre afecciones sensibles o refractarias, y puede ser predictiva de los resultados.

20 Las proteínas TweakR, los anticuerpos de la invención, los ácidos nucleicos, las proteínas modificadas, y las células que contienen secuencias de TweakR se pueden usar en ensayos de pronóstico. Como antes, se pueden generar perfiles de expresión génica que se correlacionan con un estado mórbido, con información clínica, patológica u otra información, en términos de pronóstico a largo plazo. Nuevamente, esto se puede realizar a nivel proteico o génico, prefiriéndose el uso de genes. Los genes individuales o múltiples genes pueden ser útiles en diversas combinaciones. Como antes, las sondas de TweakR se pueden unir a biochips para la detección y cuantificación de secuencias de TweakR en un tejido o paciente. Los ensayos transcurrieron como se esquematiza anteriormente para el diagnóstico. El método de PCR puede proporcionar una cuantificación más sensible y exacta.

30 6.6 Tratamiento del cáncer

Los anticuerpos descritos aquí se pueden usar para la prevención o tratamiento de la proliferación celular anormal. Como se usa aquí, proliferación celular anormal se puede manifestar como tumores o como metástasis. El término "tumor", como se usa aquí, se refiere a todo crecimiento o proliferación celular neoplásico, ya sea maligno o benigno, y todas las células y tejidos precancerosos y cancerosos. El término "metástasis" se usa aquí en el sentido más amplio, y se refiere a la diseminación del tumor, por ejemplo cáncer, de una parte del cuerpo a la otra. Los tumores formados a partir de células que se han diseminado se denominan tumores secundarios, y contienen el mismo tipo de células que el tumor original (primario). De este modo, el cáncer de próstata que se ha metastatizado al hígado o a los huesos no es cáncer de hígado o de huesos, sino cáncer de próstata metastatizado, ya que todavía contiene células de cáncer de próstata, independientemente de su localización.

45 En consecuencia, en algunas formas de realización, la administración de anticuerpos anti-TweakR puede poner en marcha el exterminio de células cancerosas. Las células cancerosas pueden estar presentes en un tumor sólido, el sistema linfático, o en el torrente sanguíneo. Como se usa aquí, "cáncer" incluye todos los neoplasmas malignos, incluyendo, pero sin limitarse a, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma, y leucemia. Los ejemplos de cánceres que se pueden seleccionar como dianas usando los métodos descritos aquí incluyen, pero no se limitan a, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer pulmonar, melanoma, cáncer pancreático, cáncer ovárico, cáncer renal, cáncer de cabeza y cuello, cáncer esofágico, cáncer uterino, cáncer de estómago, cáncer cervical, glioblastoma, y sarcomas. Los métodos terapéuticos descritos aquí se aplican habitualmente a pacientes humanos, pero se pueden aplicar a otros mamíferos.

50 En algunas formas de realización, la administración de anticuerpos anti-TweakR induce apoptosis o citolisis de células que expresan TweakR. En algunas formas de realización, la inducción de citolisis se logra vía citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). Por ejemplo, los anticuerpos anti-TweakR pueden inducir entre 10% a más de 80% de citotoxicidad de células que expresan TweakR. En algunas formas de realización, la administración de los anticuerpos anti-TweakR induce al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, u 80% o más citotoxicidad de células que expresan TweakR.

60 En algunas formas de realización, la administración de los anticuerpos anti-TweakR puede reducir el tamaño de un tumor sólido seleccionando como diana a TweakR sobre la superficie de las células cancerosas con uno o más de los anticuerpos descritos aquí. El tumor puede ser un tumor primario o un tumor secundario. A título de ejemplo, la administración de los anticuerpos anti-TweakR puede reducir el tamaño de un tumor sólido en al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, u 80% o más. En otras formas de realización, la administración de los anticuerpos anti-TweakR puede inhibir completamente o prevenir el crecimiento de un tumor sólido.

65

Se apreciará que se describe un intervalo de diferentes citotoxicidades y un intervalo de reducciones en el tamaño tumoral para los anticuerpos anti-TweakR descritos aquí. La persona experta apreciará que los anticuerpos anti-TweakR pueden tener cualquiera de las citotoxicidades descritas, y cualquiera de las reducciones descritas en el tamaño tumoral.

5 En algunas formas de realización, los métodos pueden emplear un anticuerpo anti-TweakR conjugado a un resto efector. El resto efector puede ser cualquier número de moléculas, incluyendo restos marcadores tales como marcadores radioactivos o marcadores fluorescentes, o preferiblemente puede ser un resto terapéutico. El resto efector (o "componente efector") puede estar unido (o enlazado, o conjugado) al anticuerpo anti-TweakR ya sea
10 covalentemente, a través de un ligador o un enlace químico, o no covalentemente, a través de enlaces iónicos, de van der Waals, electrostático, o de hidrógeno.

El resto terapéutico puede ser una pequeña molécula que module la actividad de TweakR. En otro aspecto, el resto terapéutico afecta a la actividad de moléculas o células asociadas con o en estrecha proximidad a TweakR. Por
15 ejemplo, el resto terapéutico puede ser un agente citotóxico. La expresión "agente citotóxico", como se usa aquí, se refiere a una sustancia que inhibe o previene la función de las células y/o provoca la destrucción de las células. La expresión pretende incluir isótopos radioactivos (por ejemplo, I^{131} , I^{125} , Y^{90} y Re^{186}), agentes quimioterapéuticos, y toxinas tales como toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o sus fragmentos. Las toxinas adecuadas y sus fragmentos correspondientes incluyen la cadena de difteria A, cadena de
20 exotoxina A, cadena de ricina A, cadena de abrina A, curcina, crotina, fenomicina, enomicina, auristatinas (por ejemplo, auristatina E, o auristatina F), y similares. La dianización del resto terapéutico contra la TweakR expresada sobre la superficie de una célula cancerosa no sólo sirve para incrementar la concentración local de resto terapéutico en el área afectada, sino también sirve para reducir los efectos secundarios perniciosos que pueden estar asociados con el resto terapéutico.

25 En otras formas de realización, los anticuerpos anti-TweakR se pueden usar en combinación con agentes terapéuticos convencionales, usados para tratar un cáncer particular. El estándar convencional de cuidado para un cáncer particular es conocido por los expertos en la técnica, y de este modo un experto en la técnica será capaz de seleccionar uno o más agentes terapéuticos para combinarlos con los anticuerpos anti-TweakR descritos aquí. A
30 título de ejemplo, el cáncer pancreático se trata actualmente usando el agente terapéutico gemcitabina, con o sin erlotinib (Tarceva®). De este modo, los anticuerpos anti-TweakR se pueden usar en combinación con gemcitabina y/o erlotinib para tratar cáncer pancreático.

Los ejemplos de otros agentes terapéuticos que se usan actualmente para tratar cáncer, y de este modo se pueden
35 usar en combinación con los anticuerpos anti-TweakR descritos aquí, incluyen, pero no se limitan a, agentes dirigidos contra dianas, agentes de quimioterapia convencionales, y agentes de terapia hormonal.

En algunas formas de realización, los anticuerpos anti-TweakR de la invención se pueden usar en combinación con
40 agentes dirigidos contra dianas. Los agentes dirigidos contra dianas incluyen, pero no se limitan a, agentes antiangiogénicos (tales como bevacizumab, sumitinib, sorafenib, temsirolimus, 2-metoxiestradiol o 2ME2, finasunato, PTK787, y vandetanib), inhibidores de EGFR (tales como erlotinib, cetuximab, panitumumab, gefitinib, lapatinib, y trastuzumab), inmunomoduladores (tales como rituximab, alemtuzumab, y aldesleucina), inhibidores de proteasoma (tales como bortezomib, PCR-171, y NPI-052), inhibidores de integrinas (tales como natalizumab, volociximab, etaracizumab, y cilengitida), agentes pro-apoptóticos (tales como mapatumumab, lexatumumab, AMG951, ABT-737, oblimersen, y plitidepsina), y agentes con otros mecanismos de acción (tales como imatinib, dasatinib, lenalidomida,
45 talidomida, aldesleucina, e interferón alfa).

En algunas formas de realización, los anticuerpos anti-TweakR de la invención se pueden usar en combinación con
50 agentes quimioterapéuticos convencionales. Los agentes quimioterapéuticos convencionales incluyen, pero no se limitan a, agentes alquilantes (tales como oxaliplatino, carboplatino, cisplatino, ciclofosfamida, melfalán, ifosfamida, uramustina, clorambucilo, mecloetamina, tiotepa, busulfán, temozolomida, y dacarbazina), anti-metabolitos (gemcitabina, arabinósido de citosina, Ara-C, capecitabina, 5FU (5-fluorouracilo), azatioprina, mercaptopurina (6-MP), 6-tioguanina, aminopterina, pemetrexed, y metotrexato), alcaloides vegetales y terpenoides (tales como docetaxel, paclitaxel, paclitaxel unido a proteína, vincristina, vinblastina, vinorelbina, vindesina, etopósido, VP-16, tenipósido, irinotecán, y topotecán), y antibióticos anti-tumorales (tales como dactinomicina, doxorubicina, doxorubicina liposomal, daunorubicina, daunomicina, epirubicina, mitoxantrona, adriamicina, bleomicina, plicamicina, mitomicina C, carminomicina, y esperamicinas).

En algunas formas de realización, los anticuerpos anti-TweakR de la invención se pueden usar en combinación con
60 agentes de terapia hormonal (tales como anastrozol, letrozol, goserelina, y tamoxifeno).

En consecuencia, los anticuerpos anti-TweakR descritos aquí se pueden usar como una monoterapia o en
65 combinación con otros agentes terapéuticos. En algunas formas de realización, los anticuerpos anti-TweakR de la invención son útiles como agentes monoterapéuticos o como parte de un régimen de terapia de combinación para el tratamiento de pacientes con cáncer que se han hecho resistentes a anticuerpos anti-EGFR. Se ha teorizado que la resistencia a anticuerpos anti-EGFR está asociada con mutaciones que dan como resultado la activación constitutiva

de la señalización mediada por EGFR (véase, por ejemplo, Jhaver, *et al.*, 2008, *Cancer Res.*, 68(6):1953-1961). Varios estudios recientes han mostrado una relación entre el estado de la mutación K-Ras y la respuesta a cetuximab, mostrando los tumores de tipo salvaje para K-Ras una respuesta mejorada a este agente (Lievre, *et al.*, 2008, *J. Clin. Oncology*, 26(3):374-379). Se encontró que las estirpes celulares de cáncer de colon con mutaciones PIK3CA activantes o pérdida de la expresión de PTEN son más resistentes a cetuximab que las estirpes celulares de PIK3CA de tipo salvaje/que expresan PTEN (Jhaver, *et al.*, 2008, *Cancer Res.*, 68(6): 1953-1961). Se ha demostrado que las mutaciones que activan la ruta de señalización de RAS/RAF son indicadores predictivos y de pronóstico en pacientes con cáncer colorrectal (Benvenuti, *et al.*, 2007, *Cancer Res.*, 67(6):2643-2648).

Muchos de los modelos de xenoinjerto usados para ensayar la eficacia de anticuerpos anti-TweakR poseen mutaciones BRAF, KRAS, PTEN, y PIK3CA, incluyendo NW231 (adenocarcinoma de mama), HT29 (adenocarcinoma colorrectal), A375 (melanoma), Calu6 (carcinoma anaplásico de pulmón), A549 (carcinoma de pulmón), 786-0 (carcinoma de célula clara renal), y HCT116 (adenocarcinoma colorrectal). En algunos de estos modelos, es decir, NW231, HT29, y A375, el anticuerpo anti-TweakR PDL192 fue eficaz a la hora de reducir y/o inhibir el crecimiento del tumor (véase la Tabla 2), sugiriendo que los anticuerpos anti-TweakR se pueden usar para tratar pacientes con cáncer que no responden a, o que se han hecho resistentes a, inhibidores de EGFR, tales como anticuerpos anti-EGFR.

En el modelo de xenoinjerto HT29, se demostró que PDL192 potencia la actividad antitumoral de la combinación de cetuximab/irinotecán en HT29 (véase, por ejemplo, la figura 18D). Estos resultados proporcionan una razón para combinar anticuerpos anti-TweakR con agentes que se dirigen a rutas diferentes como parte de un régimen de tratamiento para pacientes que no responden a, o que se hacen resistentes a, inhibidores de EGFR, tales como anticuerpos anti-EGFR.

De este modo, en algunas formas de realización, se administran anticuerpos anti-TweakR a pacientes con cáncer que no responden a, o que se hacen resistentes al tratamiento con anticuerpos anti-receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR), tales como cetuximab y panitumumab. Los anticuerpos anti-TweakR se pueden administrar solos o en combinación con otros agentes terapéuticos, incluyendo, pero sin limitarse a, agentes dirigidos contra dianas, agentes quimioterapéuticos convencionales y agentes de terapia hormonal.

Los pacientes con cáncer que son resistentes a o que no responden a anticuerpos anti-EGFR se pueden cribar en busca de mutaciones BRAF, KRAS, PTEN, y PIK3CA, como se describe en Benvenuti, *et al.* 2007, *Cancer Res.*, 67(6):2643-2648. Los pacientes que tienen mutaciones en uno o más de estos genes se identifican y se tratan con anticuerpos anti-TweakR solos o en combinación con otros agentes terapéuticos, incluyendo, pero sin limitarse a, agentes dirigidos contra dianas, agentes quimioterapéuticos convencionales y agentes de terapia hormonal.

Uno o más de los agentes terapéuticos anteriores se pueden administrar concurrentemente, antes de, o tras la administración de un anticuerpo anti-TweakR. Estos agentes se pueden administrar de forma separada, o se pueden combinar en un cóctel y se pueden administrar juntos como una única composición. La composición o composiciones se pueden administrar por cualquier medio conocido en la técnica.

Otros tratamientos útiles que se pueden usar en combinación con los anticuerpos anti-TweakR incluyen terapia de radiación.

Los anticuerpos anti-TweakR se pueden formular en una composición farmacéutica que se administra a un sujeto en una cantidad terapéuticamente eficaz. Como se usa aquí, "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad de una formulación o composición farmacéutica que es suficiente para curar, aliviar, atenuar o al menos parcialmente detener el cáncer y/o sus síntomas, y/o complicaciones. Los métodos clínicos para determinar la cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-TweakR para el tratamiento de cáncer son bien conocidos por aquellos de pericia normal en la técnica, y se pueden determinar empíricamente usando experimentación habitual. Por ejemplo, en el contexto del tratamiento de cáncer, una "cantidad terapéuticamente eficaz" es una cantidad capaz de invocar uno o más de los siguientes efectos: (1) inhibición, en cierto grado, del crecimiento tumoral, incluyendo la ralentización y la detención total del crecimiento; (2) reducción del número de células cancerosas; (3) reducción del tamaño tumoral; (4) inhibición (es decir, reducción, ralentización o detención total) de la infiltración de células cancerosas en órganos periféricos; (5) inhibición (es decir, reducción, ralentización o detención total) de la metástasis de células cancerosas; (6) potenciación de la respuesta inmunitaria anticancerosa, que puede dar como resultado, pero no tiene que hacerlo, la regresión o rechazo de un tumor; y/o (7) alivio, en cierto grado, de uno o más síntomas asociados con el trastorno.

La concentración de un anticuerpo en estas formulaciones varía ampliamente desde alrededor de 0,1 a 100 mg/ml, pero a menudo está en el intervalo de 1 a 20 mg/ml. Para los fines de tratamiento de la enfermedad, la dosis apropiada del anticuerpo dependerá de la gravedad y rumbo de la enfermedad, de la historia clínica y respuesta del paciente, de la toxicidad de los anticuerpos, y del criterio del médico. Los anticuerpos se administran de forma adecuada al paciente de una sola vez, o a lo largo de una serie de tratamientos. El régimen de dosificación y de tratamiento apropiado se puede establecer monitorizando el progreso de la terapia usando técnicas convencionales conocidas por la persona experta en la técnica.

Típicamente, las composiciones descritas aquí se administran intravenosamente a un paciente como un bolo o mediante infusión continua a lo largo de un período de tiempo; o mediante vías intramusculares, subcutáneas, intraperitoneales, o intracerebroespinales. Los métodos para preparar composiciones administrables parenteralmente son conocidos o manifiestos para el experto en la técnica, y se describen con más detalle, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Science (15ª Ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1980).

Como se describe aquí, las composiciones formuladas para uso farmacéutico comprenden uno o más de los anticuerpos anti-TweakR descritos aquí. Las composiciones comprenden además opcionalmente un vehículo. Las composiciones farmacéuticas descritas aquí comprenden típicamente un anticuerpo anti-TweakR y un vehículo farmacéutico, y habitualmente comprenden una disolución de un anticuerpo anti-TweakR, o un cóctel del mismo, disuelto en un vehículo aceptable, preferiblemente un vehículo acuoso. Se puede usar una variedad de vehículos acuosos, por ejemplo agua para inyección (WFI), o agua tamponada con fosfato, citrato, acetato, etc., hasta un pH típicamente de 5,0 a 8,0, muy a menudo 6,0 a 7,0, y/o que contiene sales tales como cloruro de sodio, cloruro de potasio, etc., para hacerla isotónica. El vehículo también puede contener excipientes tales como seroalbúmina humana, polisorbato 80, azúcares o aminoácidos, para proteger a la proteína activa.

Para uso en aplicaciones de diagnóstico y de investigación sugeridas anteriormente, también se proporcionan aquí kits. En aplicaciones de diagnóstico y de investigación, tales kits pueden incluir al menos uno de los siguientes: reactivos de ensayo, tampones, ácidos nucleicos o anticuerpos específicos de TweakR, sondas de hibridación y/o cebadores, polinucleótidos antisentido, ribozimas, polipéptidos o polinucleótidos de TweakR negativos dominantes, y/o inhibidores de tipo pequeña molécula de la secuencias asociadas a TweakR.

Además, los kits pueden incluir materiales de instrucción que contienen instrucciones (por ejemplo, protocolos) para la práctica de esta invención. Aunque los materiales de instrucción comprenden típicamente materiales escritos o impresos, no están limitados a tales. Mediante esta invención se contempla un medio capaz de almacenar tales instrucciones y comunicarlas a un usuario final. Tales medios incluyen, pero no se limitan a, medios de almacenamiento electrónico (por ejemplo, discos magnéticos, cintas, cartuchos, chips), medios ópticos (por ejemplo, CD ROM), y similares. Tales medios pueden incluir direcciones para interactuar con sitios que proporcionan tales materiales de instrucción.

De este modo, los anticuerpos anti-TweakR y los fragmentos de unión a antígeno descritos aquí, y las composiciones y kits que comprenden estos anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno, se pueden usar para terapia, y en particular para el tratamiento de cualquiera de las enfermedades descritas aquí.

7. Ejemplos

Ejemplo 1: Expresión de TweakR en tumores primarios

El análisis del perfil de expresión génica se usó para detectar la expresión de ARNm de TweakR en una variedad de tumores sólidos primarios, incluyendo cánceres pulmonares, pancreáticos, renales, de mama, y de cabeza y cuello. Se aisló ARNm de diversos cánceres y de 347 tejidos normales de adultos, y se hibridó a Eos Hu03, un chip génico Affymetrix personalizado que contiene aproximadamente 59.000 conjuntos de sondas que representan 46.000 genes, racimos EST, y exones predichos.

La expresión significativa de TweakR se detectó en 31 de 44 adenocarcinomas pulmonares, 27 de 56 carcinomas de células escamosas pulmonares, 37 de 47 tumores pancreáticos, 14 de 23 tumores de origen de cabeza y cuello, 48 de 66 cánceres ováricos, 190 de 253 cánceres colorrectales primarios y metastásicos, 11 de 11 cánceres esofágicos, 16 de 35 melanomas, 15 de 20 cánceres renales, 29 de 39 cánceres de estómago, 25 de 43 cánceres uterinos, 7 de 14 cánceres cervicales, 8 de 26 sarcomas, 23 de 93 cánceres de vejiga, y 16 de 27 glioblastomas (datos no mostrados). En cánceres de mama, 24 de 47 muestras de tumor primario procedentes de 45 pacientes mostraron expresión significativa de TweakR, y 7 de 10 tumores metastásicos de la columna vertebral expresaron TweakR (datos no mostrados).

En la figura 6, se comparan los niveles de expresión de una matriz de ADNc de TweakR en cánceres pancreático, pulmonar (adenocarcinoma y carcinoma de células escamosas) y renal con un abanico de tejidos corporales normales. Las muestras se presentan a lo largo del eje X, reflejando la altura de cada muestra la intensidad media o nivel de expresión de TweakR. Las muestras con niveles de expresión por encima de la línea discontinua horizontal en 100 se consideran positivas para la expresión de TweakR.

También se usó la tinción inmunohistoquímica usando anticuerpos anti-TweakR para examinar la expresión de TweakR en tumores sólidos de adenocarcinoma pulmonar, carcinoma de células escamosas del pulmón, y cáncer pancreático. Se incubaron muestras tumorales crioconservadas con el anticuerpo anti-TweakR 29.T10 (5 µg/ml). Se añadió anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante, seguido del desarrollo del color con diaminobencidina (DAB).

La tinción inmunohistoquímica estuvo de acuerdo con los resultados del chip génico. Usando anticuerpos contra TweakR (29.T10, 374.2, y 349.2), se detectó proteína TweakR en adenocarcinomas de pulmón, carcinomas de células escamosas del pulmón, adenocarcinomas pancreáticos, carcinomas de células renales, carcinomas ductales de mama, adenocarcinomas colorrectales, carcinomas ováricos, adenocarcinomas de estómago, cánceres de vejiga, y cánceres de origen de cabeza y cuello. La figura 7 es un ejemplo típico de la tinción de la proteína TweakR usando anticuerpo 29.T10 en tumores sólidos.

Ejemplo 2: Generación y caracterización de anticuerpos anti-TweakR

10 GENERACIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-TWEAKR

Anticuerpos monoclonales

15 Se generaron anticuerpos monoclonales inmunizando ratones Balb/c intraperitonealmente con células 3T12 de ratón que sobreexpresan TweakR humana. Los bazoos se recogieron, y los esplenocitos se fusionaron con la estirpe celular de mieloma múltiple, NS0. Los hibridomas se seleccionaron usando aminopterina. Los hibridomas que expresan anticuerpos anti-TweakR de interés se subclonaron varias veces para aislar clones individuales.

Humanización de 19.2.1 para crear PDL192

20 La humanización de 19.2.1 se llevó a cabo esencialmente según el procedimiento de Queen, C. *et al.* (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 10029-10033 (1989)). En primer lugar, se identificaron segmentos VH y VL humanos con homología elevada con las secuencias de aminoácidos de VH y VL de 19.2.1, respectivamente. A continuación, las secuencias de CDR, junto con los aminoácidos de entramado importantes para mantener las estructuras de las CDR, se transplantaron en las secuencias de entramado humanas seleccionadas. El anticuerpo monoclonal humanizado resultante (PDL192) se expresó en la estirpe celular de mieloma de ratón NS0.

Clonación y secuenciación de ADNc de la región variable de 19.2.1

30 Se extrajo ARN total de aproximadamente 5×10^7 células de hibridoma que producen 19.2.1 usando el reactivo TRIzol (Life Technologies, Inc., Rockville, MD). Se sintetizó ADNc bicatenario usando el kit de amplificación de ADNc SMART RACE (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA) siguiendo el protocolo del proveedor. Los ADNc de la región variable para las cadenas pesada y ligera se amplificaron mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando los cebadores de 3' que se hibridan respectivamente a las regiones C de las cadenas gamma y kappa de ratón, y un cebador universal de 5' proporcionado en el kit de amplificación de ADNc SMART RACE. Los ADNc de VH y VL se subclonaron en el vector pCR4Blunt-TOPO (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) para la determinación de la secuencia. La secuenciación del ADN se llevó a cabo mediante reacciones de secuenciación de ciclos de PCR con terminadores de cadena didesoxi fluorescentes (Applied Biosystems, Foster City, CA) según las instrucciones del fabricante. Para cada una de las regiones variables de las cadenas pesada y ligera se secuenciaron múltiples clones plasmídicos.

Diseño de las regiones V de PDL192

45 La humanización de las regiones V del anticuerpo se llevó a cabo como se esquematiza por Queen, C. *et al.* (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 10029-10033 (1989)). En primer lugar, se construyó un modelo molecular de las regiones variables de 19.2.1 con la ayuda de los programas de ordenador ABMOD y ENCAD (Levitt, M., J. Mol. Biol. 168: 595-620 (1983)). A continuación, basándose en la búsqueda de homología frente a secuencias de ADNc de anticuerpos humanos, se seleccionaron las secuencias apropiadas de los segmentos VH, VL, y J humanas para proporcionar los entramados para las regiones variables de PDL192.

50 En las posiciones del entramado en las que el modelo de ordenador sugirió un contacto significativo con las CDR, se sustituyeron los aminoácidos de las regiones V de 19.2.1 por los aminoácidos del entramado humano originales. Esto se hizo en los restos 73, 74, 93, y 94 de la cadena pesada. Para la cadena ligera, la sustitución se realizó en el resto 49. Obsérvese que el sistema de numeración usado aquí es el de Kabat (Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª ed., National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)).

Construcción de los genes VH y VL de PDL192

60 Los segmentos de ADN que codifican cada una de VH y VL de PDL192 se diseñaron como minixones que incluyen un péptido señal, una señal donante de ajuste, y sitios de enzimas de restricción apropiados para la clonación subsiguiente en un vector de expresión de mamífero. Los minixones de VH y VL de 19.2.1 se construyeron mediante alargamiento de oligonucleótidos sintéticos solapantes que oscilan en longitud desde 33 hasta 43 bases, y mediante amplificación por PCR (Stemmer *et al.*, Gene 164:49-53 (1995)). Los fragmentos amplificados mediante PCR se purificaron mediante el kit de purificación mediante PCR Qiaquick (Qiagen), se digirieron con enzimas de restricción apropiadas, se clonaron en un vector para la expresión que contiene dominios constantes kappa y de IgG1 humana, y se expresaron en células NS0 de ratón.

La humanización de PDL400 a partir de ITEM4 fue similar al procedimiento descrito anteriormente para PDL192, excepto que se seleccionaron diferentes sustituciones de entramado basándose en el modelo de ordenador.

5 AFINIDADES DE UNIÓN

Las afinidades de unión relativas de diversos anticuerpos anti-TweakR de ratón y humanizados se evaluaron en un ensayo Biacore usando una forma soluble del dominio extracelular de TweakR humana. De forma breve, en primer lugar se inmovilizó anticuerpo anti-Fc de ratón de cabra o anti-Fc humano de cabra a la superficie del biosensor, seguido de la captura del anticuerpo sobre la superficie de ensayo. Subsiguientemente, se inyectó la forma soluble del dominio extracelular de TweakR humana para medir la unión a, y la disociación del, anticuerpo. Las afinidades de unión relativas de diversos anticuerpos de ratón, incluyendo 19.2.1, 136.1, y 18.3.3, y diversos anticuerpos humanizados, incluyendo PDL192 y PDL400, se muestran en la Tabla 1.

15 TABLA 1

Anticuerpos Anti-TweakR	Afinidad de unión (K_D)
PDL192	5,5 nM
19.2.1	7,12 nM
136.1	0,68 nM
18.3.3	0,23 nM
PDL400	0,58 nM

Como se muestra en la Tabla 1, la afinidad de PDL192 fue similar a la del anticuerpo progenitor murino, 19.2.1. De este modo, el proceso de humanización no alteró significativamente la afinidad de unión del anticuerpo.

20 ACTIVIDADES AGONISTA/ANTAGONISTA

TWEAK, el ligando para TweakR, activa múltiples rutas de señalización, dando como resultado efectos pleiotrópicos sobre células, incluyendo el incremento de la expresión de citocinas y quimiocinas, la estimulación de angiogénesis, y la inducción de apoptosis en células cancerosas. Los anticuerpos anti-TweakR se evaluaron para determinar sus capacidades para ejercer actividades biológicas atribuidas a TWEAK usando varios ensayos *in vitro* diseñados para medir los efectos de los anticuerpos anti-TweakR sobre el crecimiento celular, estimulación de angiogénesis y expresión de citocinas y quimiocinas.

30 En los ensayos de crecimiento celular, se incubaron células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC), células del músculo liso de la arteria coronaria, fibroblastos pulmonares, o hepatocitos durante 3 días en presencia de 100 ng/ml de TWEAK o 10 μ g/ml de anticuerpo de control de isotipo o el anticuerpo anti-TweakR, 19.2.1. La viabilidad celular se evaluó usando azul de alamar. Comparado con las células tratadas con el isotipo, el crecimiento de las HUVEC se estimuló mediante TWEAK o 19.2.1 (datos no mostrados). En estas células, TWEAK potenció el crecimiento en 2,4 veces, mientras que 19.2.1 estimuló un incremento de 1,6 veces el crecimiento. Ni TWEAK ni 19.2.1 tuvieron ningún efecto sobre el crecimiento de células del músculo liso de la arteria coronaria, células del músculo liso aórticas, fibroblastos pulmonares, o hepatocitos.

40 Los anticuerpos anti-TweakR se evaluaron para determinar sus capacidades para promover la formación de tubos endoteliales *in vitro*. Se incubaron células HUVEC en una matriz de fibrina en presencia de 200 ng/ml de TWEAK, 10 μ g/ml de anticuerpo de control de isotipo o 10 μ g/ml de 19.2.1. Después de 6 días, se cuantificó la longitud de los tubos generados. Tanto TWEAK como 19.2.1 estimularon la formación de tubos endoteliales, mostrando TWEAK un incremento de aproximadamente 3,5 veces en la longitud total de los tubos, y estimulando 19.2.1 un incremento de 2,5 veces (datos no mostrados).

45 Se ensayó la capacidad de los anticuerpos anti-TweakR para estimular la expresión de citocinas y quimiocinas en un número de estirpes celulares de cáncer y también en células humanas primarias normales, incluyendo células endoteliales, hepatocitos, fibroblastos pulmonares, y células del músculo liso de la arteria coronaria. Las células se incubaron *in vitro* durante 24 horas con TWEAK a 100 ng/ml, o con un anticuerpo anti-TweakR a 10 μ g/ml. Veinticuatro horas más tarde, el sobrenadante celular se evaluó para determinar la presencia de hasta 15 citocinas y quimiocinas diferentes usando un ensayo multiplex comercial a base de perlas fluorescentes (Luminex®; Upstate).

55 Cada tipo celular liberó un conjunto único de citocinas/quimiocinas en respuesta a TWEAK. Algunos de los anticuerpos anti-TweakR, tales como 19.2.1 y PDL192 indujeron secreción del mismo subconjunto de citocinas/quimiocinas (por ejemplo, IL-8, IL-6, GM-CSF, MCP-1, RANTES, e IP-10) que TWEAK, pero a menores concentraciones. TWEAK, 19.2.1, y PDL192 no estimularon la liberación de IFN γ , TNF α , TNF β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, o IL-13 a partir de cualquier tipo celular examinado (datos no mostrados).

Basándose en los resultados anteriores, se usó la liberación de IL-8 a partir de células de melanoma A375 por anticuerpos anti-TweakR como el ensayo de elección para caracterizar la actividad agonista/antagonista de los diversos anticuerpos, así como anticuerpos anti-TweakR previamente identificados, incluyendo ITEM1, ITEM2, ITEM3, e ITEM 4 (Nakayama, *et al.*, 2003, Biochem Biophysical Res Comm., 306:819-825). figura 8 representa la liberación de IL-8 por ITEM1, ITEM2, ITEM3, e ITEM 4 (usados todos a 10 µg/ml), así como diversos controles de isotipo. Como se ilustra en la figura 8, todos los anticuerpos ITEM tienen actividad agonista, por cuanto que inducen cierta expresión de IL-8 cuando se incuban con células A375. Además, todos los anticuerpos ITEM tienen cierta actividad antagonista, por cuanto, cuando se incuban células A375 con el ligando TWEAK (300 ng/ml) más los anticuerpos, la cantidad de IL-8 liberada es menor que la observada con el tratamiento con TWEAK solo. Los agentes con actividad antagonista pura, una forma soluble de dominio extracelular de TweakR (TweakR-Fc) y un anticuerpo anti-TWEAK neutralizante, se muestran para comparación.

Los ensayos de liberación de IL-8 representativos para los anticuerpos anti-TweakR PDL192, 18.3.3, 136.1 y PDL 400 se muestran en las figuras 8B, 8C, 8D, y 8E, respectivamente. Como se muestra en las figuras 8B-8E, las actividades agonistas/antagonistas difieren entre los anticuerpos descritos aquí. Por ejemplo, PDL192 (figura 8B) y 19.2.1 (datos no mostrados) no tienen virtualmente ninguna actividad antagonista, es decir, no bloquean la liberación de IL-8 inducida por TWEAK. PDL 400 (figura 8E) y 18.3.3 (figura 8C) tienen actividades agonistas y antagonistas. El anticuerpo anti-TweakR 136.1 (figura 8D) tiene actividad agonista muy elevada, lo que descarta la evaluación de su actividad antagonista en este ensayo.

ACTIVIDAD ANTITUMORAL *IN VITRO*

Se emplearon dos ensayos para evaluar los efectos antiproliferativos de anticuerpos anti-TweakR *in vitro*, un ensayo dependiente de anclaje (un ensayo de proliferación) y un ensayo independiente de anclaje (un ensayo de formación de colonias). En la figura 9 se muestra un ensayo antiproliferativo típico que usa 19.2.1 en células de melanoma A375. En conjunto, PDL192 y 19.2.1 disminuyeron la proliferación de 15 de 40 estirpes celulares cancerosas que expresan TweakR, y redujeron el potencial de formación de colonias de 9 de 33 estirpes celulares cancerosas que expresan TweakR (datos no mostrados).

Los anticuerpos anti-TweakR, PDL192, 19.2.1, y 136.1, se ensayaron para determinar la capacidad para disminuir o inhibir el crecimiento de las células cancerosas induciendo apoptosis a través de la activación de caspasa. Se incubaron células de cáncer de colon HT29 tratadas con IFN γ con titulaciones de los tres anticuerpos. En 1-2 días de tratamiento con anticuerpo, las células se evaluaron para determinar la activación de caspasa 3/7. Como se muestra en las figuras 10A-10B, PDL192 y 136.1, fueron capaces de inducir apoptosis a través de la activación de caspasa en HT29. 19.2.1 tuvo un efecto similar (dato no mostrado). En otras estirpes celulares cancerosas, parece que la apoptosis no es el mecanismo mediante el cual los anticuerpos anti-TweakR inhiben la proliferación; en estas estirpes celulares, se postura que los anticuerpos median la actividad a través de un mecanismo o mecanismos alternativos que provocan una reducción en la proliferación en un ensayo de crecimiento a más largo plazo de 7-10 días (dato no mostrado).

Ejemplo 3: Actividad tumoral *in vivo* de anticuerpos anti-TweakR

El tratamiento con anticuerpos anti-TweakR *in vivo* se llevó a cabo sobre modelos de xenoinjerto generados a partir de un número de estirpes celulares cancerosas. Como se muestra en la Tabla 2, los anticuerpos anti-TweakR fueron eficaces reduciendo y/o inhibiendo el crecimiento de un número de diferentes cánceres.

Tabla 2. Sumario de la actividad antitumoral en modelos de xenoinjerto

Tipo de tejido tumoral	Modelo de xenoinjerto	Porcentaje de inhibición por ¹			
		19.2.1	PDL192	18.3.3	PDL400
Carcinoma de célula renal	SN12C	98%	95%	nt2	95%
	786-0	nt	NS3	nt	nt
Adenocarcinoma de mama	Variante MDA-MB-231	42%	81%	nt	nt
	MDA-MB-453	nt	NS	nt	nt
Adenocarcinoma colorrectal	HT29	nt	78%	nt	nt
	Lovo	nt	NS	nt	nt
	VACO9P	nt	NS	nt	nt
	HCT116	NS	nt	nt	nt
Melanoma	A375	65%	69%	69%	nt
	LOX	nt	60%	nt	nt
Carcinoma ovárico	CSOC882-2	nt	89%	nt	nt
	ES2	nt	75%	nt	nt
	SK-OV-3	nt	NS	nt	nt
Adenocarcinoma pancreático	Panel	nt	79%	nt	nt
	BxPC3	NS	nt	nt	nt

Tipo de tejido tumoral	Modelo de xenoinjerto	Porcentaje de inhibición por ¹			
		19.2.1	PDL192	18.3.3	PDL400
carcinoma de glándulas salivares	A253	86%	73%	54%	70%
Carcinoma de vejiga urinaria	HT1376	36%	48%	nt	56%
Glioblastoma	U118	nt	40%	nt	nt
Carcinoma pulmonar	H358	nt	58%	nt	nt
	Calu6	21%	26%	nt	29%
	A549	30%	25%	nt	nt
	EKVX	NS	nt	nt	nt

¹ El porcentaje de inhibición se calculó comparando el volumen tumoral medio de animales de control con los animales tratados, usando medidas tomadas el día de sacrificio del grupo de los animales de control (cuando la mayoría de los tumores estuvo en el límite permisible).

² nt: no ensayado.

³ NS: ninguna diferencia significativa entre grupos tratados con el anticuerpo anti-TweakR y grupos tratados con el control de isotipo.

5 Se inoculó subcutáneamente a ratones con inmunodeficiencia severa combinada (SCID) con células de cáncer renal SN12C. Cuando los tumores alcanzaron aproximadamente 100 mm³, se dosificó intraperitonealmente a los animales con PDL192, PDL400, o 19.2.1, o un anticuerpo de control de isotipo a 10 mg/kg, 3 veces por semana durante 3 semanas. También se usó un estudio de búsqueda de intervalo de dosis para determinar el intervalo de niveles de dosificación eficaces con PDL192 en el modelo de SN12C. En este modelo, se dosificó a los animales con PDL192 a 10 mg/kg, 5 mg/kg, 2,5 mg/kg, 1 mg/kg, 0,3 mg/kg, o 0,1 mg/kg, o anticuerpo de control de isotipo a 10 mg/kg, 3 veces por semana durante 3 semanas.

10 PDL192 provoca regresión tumoral en el modelo de xenoinjerto de cáncer renal SN12C. Se observaron resultados similares con PDL400 y 19.2.1 (datos no mostrados). En el estudio de hallazgo del intervalo de dosis, mostrado en la figura 11, se observó regresión tumoral con PDL192 a dosis tan bajas como 1 mg/kg. A una menor dosis de 0,3 mg/kg, no se logró regresión, pero se observó actividad antitumoral significativa de PDL192.

15 Se inoculó subcutáneamente a ratones con inmunodeficiencia severa combinada (SCID) con células de cáncer de la glándula salivar A253. Cuando los tumores alcanzaron aproximadamente 100 mm³, se dosificó intraperitonealmente a los animales con 19.2.1, PDL192, 18.3.3, y PDL400, o con anticuerpo de control de isotipo a 10 mg/kg, 3 veces por semana durante 3 semanas. Los estudios de hallazgo del intervalo de dosis en el modelo A253 de cáncer de cabeza y cuello también se usaron con 19.2.1 para determinar la concentración mínima de anticuerpo circulante que muestra actividad biológica (concentración sérica eficaz mínima). Se inoculó subcutáneamente a ratones con inmunodeficiencia severa combinada (SCID) con células de cáncer de la glándula salivar A253. Cuando los tumores alcanzaron aproximadamente 100 mm³, se dosificó intraperitonealmente a los animales con 19.2.1 a 10 mg/kg, 5 mg/kg, 2,5 mg/kg, 1 mg/kg, o 0,5 mg/kg, o con anticuerpo de control de isotipo a 10 mg/kg, 3 veces por semana durante 3 semanas.

25 Como se muestra en la figura 12, a nivel de dosis de 10 mg/kg, se observa actividad antitumoral significativa con 19.2.1 en el modelo A253 de cáncer de cabeza y cuello. Se obtuvieron resultados similares con PDL192, 18.3.3, y PDL400 (datos no mostrados). En el estudio de hallazgo del intervalo de dosis representado en la figura 12, la actividad antitumoral máxima con 19.2.1 en el modelo A253 de cáncer de cabeza y cuello se logra a 5 mg/kg, y la actividad mínima se observa a 0,5 mg/kg. En un estudio distinto, se evaluaron las concentraciones séricas de 19.2.1 a estos mismos niveles de dosis. El nivel de dosis de 5 mg/kg, cuando se observó actividad antitumoral máxima, se correlacionó con concentraciones de anticuerpo circulante de 20-120 µg/ml. La actividad biológica mínima, observada al nivel de dosis de 0,5 mg/kg, se correlacionó con una concentración de anticuerpo de 1-7 µg/ml (dato no mostrado). Este intervalo de dosis caracteriza la ventana terapéutica potencial para anticuerpos anti-TweakR.

35 Se inoculó subcutáneamente a ratones con inmunodeficiencia severa combinada (SCID) con células de carcinoma de glándula salivar A253. Cuando los tumores alcanzaron aproximadamente 100 mm³, se dosificó intraperitonealmente a los animales con 19.2.1 a 5 mg/kg, o con anticuerpo de control de isotipo a 10 mg/kg, 3 veces por semana durante 3 semanas (9 dosis) o durante 7 semanas (22 dosis) (19.2.1 solamente).

40 En el modelo de xenoinjerto A253 de cáncer de cabeza y cuello, 19.2.1 inhibió significativamente el crecimiento tumoral. La eficacia de 19.2.1 se evaluó en ratones que recibieron 9 dosis a 5 mg/kg durante 3 semanas, o 22 dosis a 5 mg/kg durante el transcurso de 7 semanas (figura 13). Para ambos grupos de dosificación, el crecimiento tumoral se inhibió significativamente durante el período de dosificación, y estaba completamente inhibido para aproximadamente 3 semanas tras la dosificación (figura 13). Este resultado sugiere que la actividad antitumoral se mantiene hasta que la concentración de anticuerpo circulante cae por debajo del nivel mínimo requerido para la eficacia.

Se inoculó subcutáneamente a ratones con inmunodeficiencia severa combinada (SCID) con células de carcinoma de vejiga urinaria HT1376. Cuando los tumores alcanzaron aproximadamente 100 mm³, se dosificó intraperitonealmente a los animales con PDL192, 19.2.1, y PDL400, o con el anticuerpo de control de isotipo a 10 mg/kg, 3 veces por semana durante 7 dosis.

5 En el modelo de xenoinjerto de vejiga urinaria HT1376, el crecimiento tumoral se inhibió moderadamente. La figura 14 representa la reducción del crecimiento tumoral tras el tratamiento con PDL192. Se obtuvieron resultados similares usando 19.2.1 y PDL400.

10 Se inoculó subcutáneamente a ratones con inmunodeficiencia severa combinada (SCID) con células de melanoma A375. Cuando los tumores alcanzaron aproximadamente 100 mm³, se dosificó intraperitonealmente a los animales con PDL192, 19.2.1, y 18.3.3, o con el anticuerpo de control de isotipo a 10 mg/kg, 3 veces por semana durante 3 semanas. También se usó un estudio de búsqueda del intervalo de dosis para determinar el intervalo de niveles de dosis eficaces con PDL192 en el modelo A375. En este estudio, se dosificó a los animales con PDL192 a 10 mg/kg, 15 5 mg/kg, 2,5 mg/kg, 1 mg/kg, 0,3 mg/kg, o 0,1 mg/kg, o con el anticuerpo de control de isotipo a 10 mg/kg, 3 veces por semana (qs) durante 3 semanas.

20 En el modelo de xenoinjerto de melanoma A375 3qs, el crecimiento tumoral se inhibió significativamente usando PDL192 a 10 mg/kg (figura 15). Se obtuvieron resultados similares usando 19.2.1 y 18.3.3 (datos no mostrados). La figura 15 representa la reducción del crecimiento tumoral tras el tratamiento con PDL192 en el estudio de búsqueda de intervalo de dosis, con actividad antitumoral significativa observada en todos los niveles de dosis, incluso tan bajas como 0,1 mg/kg.

25 Se llevó a cabo un estudio de búsqueda de intervalo de dosis separado en el modelo de xenoinjerto A375 para correlacionar las actividades biológicas mínimas y óptimas de PDL192 con las concentraciones de anticuerpo circulante. Se inoculó subcutáneamente a ratones con inmunodeficiencia severa combinada (SCID) con células de melanoma A375. Cuando los tumores alcanzaron aproximadamente 100 mm³, se dosificó intraperitonealmente a los animales con PDL192 a 5 mg/kg, 1 mg/kg, 0,6 mg/kg, 0,3 mg/kg, o 0,1 mg/kg, o con anticuerpo de control de isotipo a 5 mg/kg, cada tres días (q3d) durante un total de 8 dosis. Los animales se sangraron a diversos tiempos a lo largo del estudio para medir las concentraciones de PDL192 en el suero.

30 En el estudio de búsqueda de intervalo de dosis de A375 q3d, PDL192 mostró actividad antitumoral óptima a los niveles de dosis de 1 mg/kg y 5 mg/kg (datos no mostrados), cuando las concentraciones séricas de punto mínimo de PDL192 fueron 2,4 y 62 µg/ml y las concentraciones séricas pico fueron 5,9 y 85 µg/ml. Se observó actividad antitumoral mínima a moderada a los niveles de dosis de 0,1, 0,3 y 0,6 mg/kg (datos no mostrados), en los que las concentraciones séricas de punto mínimo de PDL192 fueron 0,97 ng/ml, 4,1 ng/ml, y 27 ng/ml, respectivamente, y las concentraciones séricas pico fueron 0,087, 1,4, y 3 µg/ml, respectivamente. Este intervalo de dosis caracteriza la ventana terapéutica potencial para anticuerpos anti-TweakR.

40 Se inoculó subcutáneamente a ratones con inmunodeficiencia severa combinada (SCID) con células de carcinoma de cáncer ovárico CSOC. Cuando los tumores alcanzaron aproximadamente 100 mm³, se dosificó intraperitonealmente a los animales con PDL192 o con anticuerpo de control de isotipo a 10 mg/kg, 3 veces por semana durante 3 semanas.

45 En el modelo de xenoinjerto de cáncer ovárico CSOC, el crecimiento tumoral se inhibió fuertemente por PDL192. La figura 16 representa la reducción del crecimiento tumoral tras el tratamiento con PDL192.

50 Se inoculó subcutáneamente a ratones con inmunodeficiencia severa combinada (SCID) con células de cáncer pancreático Panc1. Cuando los tumores alcanzaron aproximadamente 100 mm³, se dosificó intraperitonealmente a los animales con PDL192 a 10 mg/kg, o con anticuerpo de control de isotipo a 10 mg/kg, o con PDL192 a 10 mg/kg y gemcitabina a 60 mg/kg, o con anticuerpo de control de isotipo a 10 mg/kg y gemcitabina a 60 mg/kg. Los animales recibieron dosis de anticuerpo 3 veces por semana durante 3 semanas y/o gemcitabina 2 veces por semana durante 5 dosis.

55 En el modelo de xenoinjerto Panc1, el crecimiento tumoral se inhibió significativamente por PDL192. La combinación de PDL192 y gemcitabina dio como resultado la regresión tumoral del 100%. La figura 17 representa la reducción del crecimiento tumoral tras el tratamiento con PDL192 ± gemcitabina.

60 Se inoculó subcutáneamente a ratones con inmunodeficiencia severa combinada (SCID) con células de cáncer colorrectal HT29. Cuando los tumores alcanzaron aproximadamente 100 mm³, se dosificó intraperitonealmente a los animales con PD192 a 10 mg/kg o 0,5 mg/kg, con anticuerpo de control de isotipo a 10 mg/kg, con cetuximab a 10 mg/kg, con irinotecán a 25 mg/kg y anticuerpo de control de isotipo a 10 mg/kg, con irinotecán a 25 mg/kg y cetuximab a 10 mg/kg, con irinotecán a 25 mg/kg y PDL192 a 0,5 mg/kg, con PDL192 a 0,5 mg/kg y cetuximab a 10 mg/kg, o con PDL192 a 0,5 mg/kg y cetuximab a 10 mg/kg e irinotecán a 25 mg/kg. Los animales recibieron dosis de anticuerpo 3 veces por semana durante 3 semanas y/o irinotecán 2 veces por semana durante 3 semanas.

65

En el modelo de xenoinjerto HT29, el crecimiento tumoral se inhibió fuertemente por PDL192 a un nivel de dosis de 10 mg/kg. La Figura 18A representa la inhibición del crecimiento tumoral por PDL192 a 10 mg/kg. A una menor dosis de 0,5 mg/kg, PDL192 solo no inhibió el crecimiento tumoral, pero potenció significativamente la actividad antitumoral de irinotecán. La Figura 18B representa la reducción del crecimiento tumoral tras el tratamiento con PDL192 ± irinotecán.

Las células de cáncer colorrectal HT29 son mutantes para B-raf. En contraste con la potente actividad antitumoral de PDL192 a 10 mg/kg en el modelo de xenoinjerto HT29, cetuximab a 10 mg/kg no mostró inhibición del crecimiento tumoral. Sin embargo, la combinación de cetuximab a 10 mg/kg con una dosis baja de PDL192 a 0,5 mg/kg dio como resultado una inhibición estadísticamente significativa del crecimiento tumoral. La Figura 18C representa la falta de actividad antitumoral de cetuximab solo en el modelo de xenoinjerto HT29, y la inhibición del crecimiento tumoral de la combinación cetuximab/PDL192.

En el modelo de xenoinjerto HT29, el tratamiento de la combinación de cetuximab y irinotecán dio como resultado una inhibición significativa del crecimiento tumoral. A una dosis baja de 0,5 mg/kg, aunque PDL192 solo no inhibió el crecimiento tumoral, potenció la actividad antitumoral de la combinación cetuximab/irinotecán. La Figura 18D representa la reducción del crecimiento tumoral tras el tratamiento con cetuximab/irinotecán ± PDL192.

Se inoculó ortotópicamente a ratones con inmunodeficiencia severa combinada (SCID) en una almohadilla de grasa mamaria con una variante de la estirpe celular de cáncer de mama MDA-MB-231. Cuando los tumores alcanzaron aproximadamente 100 mm³, a los animales se les dosificó intraperitonealmente con PDL192 o 19.2.1, o con anticuerpo de control de isotipo a 10 mg/kg, 3 veces por semana durante 3 semanas. También se usó un estudio de búsqueda de intervalo de dosis para determinar el intervalo de niveles de dosis eficaces con PDL192 en este modelo. En este estudio, a los animales se les dosificó con PDL192 a 10 mg/kg, 3 mg/kg, 1 mg/kg, o 0,3 mg/kg, o con anticuerpo de control de isotipo a 10 mg/kg, 3 veces por semana durante 3 semanas.

En el modelo de la variante MDA-MB-231, PDL192 inhibió de forma significativa el crecimiento de tumores primarios. La figura 19A representa la reducción en el tamaño del tumor primario tras el tratamiento con PDL192. Se obtuvieron resultados similares usando 19.2.1 (datos no mostrados). El modelo de la variante MDA-MB-231 muestra crecimiento metastásico en los pulmones de ratones que poseen tumores. La cuantificación de las metástasis pulmonares reveló que PDL192 redujo significativamente el establecimiento y crecimiento de metástasis pulmonar en ratones tratados. La figura 19B representa la inhibición de metástasis pulmonares. El crecimiento metastásico fue más sensible al tratamiento con PDL192 que lo que lo fue el crecimiento de tumores primarios.

Ejemplo 4: Actividad ADCC *in vitro*

Las actividades antitumorales *in vivo* de los anticuerpos anti-TweakR son probablemente debidas, en parte, a la capacidad de los anticuerpos para estimular citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) a través de la porción Fc de la molécula de anticuerpo. Para determinar si ADCC estuvo implicada en las actividades antitumorales de los anticuerpos anti-TweakR, incluyendo PDL192, 19.2.1, PDL400, 136.1 y 18.3.3, los anticuerpos se incubaron *in vitro* con: 1) células transfectantes TweakR en presencia de células mononucleares de sangre periférica humana (PBMCs) sanas, 2) estirpes celulares cancerosas en presencia de PBMCs, 3) células transfectantes TweakR en presencia esplenocitos de ratón, o 4) estirpes celulares cancerosas en presencia de esplenocitos de ratón.

Una estirpe celular transfectante TweakR se marcó con ⁵¹Cr y se incubó con PBMCs humanas a una relación 50:1 de células efectoras:células diana en presencia de una titulación de PDL192, 19.2.1, PDL400, y 18.3.3, o de anticuerpos de control de isotipo. Se observó actividad ADCC con los cuatro anticuerpos en el transfectante TweakR con PBMCs humanas. La figura 20A representa un experimento típico que usa PDL192. Se obtuvieron resultados similares con los otros tres anticuerpos (datos no mostrados).

La estirpe celular de cáncer renal SN12C se marcó con ⁵¹Cr y se incubó con PBMCs humanas a una relación 50:1 de células efectoras:células diana en presencia de una titulación de PDL192 y PDL400, o de anticuerpos de control de isotipo. Se observó actividad ADCC con ambos anticuerpos contra células SN12C con PBMCs humanas. La figura 20B representa un experimento típico que usa PDL192. Se obtuvieron resultados similares con PDL400 (datos no mostrados).

Se marcó una estirpe celular transfectante TweakR con ⁵¹Cr y se incubó con esplenocitos de ratón a una relación de 50:1 de células efectoras:células diana en presencia de una titulación de PDL192, 19.2.1, PDL400, 136.1 y 18.3.3, o de anticuerpos de control de isotipo. Se observó actividad ADCC con los cinco anticuerpos en el transfectante TweakR con esplenocitos de ratón. La figura 20C representa un experimento típico que usa PDL192. Se obtuvieron resultados similares con los otros cuatro anticuerpos (datos no mostrados).

Ejemplo 5: Actividad antitumoral *in vivo* a través de múltiples mecanismos de acción

La región Fc de 19.2.1 se cambió de IgG2a murino a IgG1 murino, generando 19.2.1xG1. En ensayos *in vitro*, 19.2.1 y 19.2.1xG1 mostraron una unión similar a células que expresan TweakR, y ambos anticuerpos exterminaron células

de cáncer de colon HT29 de una manera dependiente de la dosis. Sin embargo, aunque 19.2.1 indujo potencialmente ADCC en un transfectante TweakR, 19.2.1xG1 mostró una actividad ADCC débil.

5 Se inoculó subcutáneamente a ratones con inmunodeficiencia severa combinada (SCID) con células de cáncer renal SN12C o con células de melanoma A375. Cuando los tumores alcanzaron aproximadamente 100 mm³, a los animales se les dosificó intraperitonealmente con 19.2.1, 19.2.1xG1, o con anticuerpo de control de isotipo IgG1 murino a 10 mg/kg, 3 veces por semana durante 3 semanas.

10 En el modelo de xenoinjerto de cáncer renal SN12C, el tratamiento con 19.2.1 dio como resultado una regresión tumoral total. Por el contrario, 19.2.1xG1 mostró actividad antitumoral mínima (figura 20A). En el modelo de xenoinjerto de melanoma A375, ambos isotipos de 19.2.1 mostraron actividad antitumoral igualmente potente (figura 21B).

15 Aunque se han ilustrado y descrito diversas formas de realización específicas, se apreciará que se pueden realizar diversos cambios sin separarse de la invención como se define mediante las reivindicaciones.

Listado de secuencias

20 <110> PDL BioPharma, Inc.

<120> USO TERAPÉUTICO DE ANTICUERPOS ANTIRRECEPTOR TWEAK

<130> 214 WO 01

25 <160> 133

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 1043

30 <212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

```

tcgacccacg cgtccgcca cgcgtccgcc cacgcgtccg ggcgcaggac gtgcactatg      60
gctcggggct cgtcgcgcc gttgctgcgg ctctcgtgc tgggctctg gctggcgttg      120
ctgcgctccg tggccgggga gcaagcgcca ggcaccgcc cctgctcccg cggcagctcc      180
tggagcgcgg acctggacaa gtgcatggac tgcgcgtctt gcagggcgcg accgcacagc      240
gacttctgcc tgggctgccc tgcagcacct cctgccccct tccggctgct ttggcccatc      300
cttgggggcg ctctgagcct gaccttcgtg ctggggctgc tttctggctt tttggtctgg      360
agacgatgcc gcaggagaga gaagttcacc acccccatag aggagaccgg cggagagggc      420
tgcccagctg tggcgtgat ccagtgacaa tgtgccccct gccagccggg gctcgcgccac      480
tcatcattca ttcattcatt cttagaccag tctctgcctc ccagacgcgg cgggagccaa      540
gctcctccac cacaaggggg gtggggggcg gtgaatcacc tctgaggcct ggcccaggg      600
ttcaggggaa ccttccaagg tgtctggttg cctgcctct ggctccagaa cagaaaggga      660
gcctcacgct ggctcacaca aacagctga cactgactaa ggaactgcag catttgaca      720
ggggaggggg gtgccctcct tcttagaggg cctgggggcc aggctgactt ggggggcaga      780
cttgacacta ggccccactc actcagatgt cctgaaatc caccacgggg gtcaccctgg      840
ggggttaggg acctattttt aacactaggg ggctggccca ctaggagggc tggccctaag      900
atacagaccc ccccaactcc ccaaagcggg gaggagatat ttattttggg gagagtttgg      960
aggggagggg gaatttatta ataaaagaat cttaacttt aaaaaaaaaa aaaaaaagg      1020
gcggccgctc tagaggatcc etc                                             1043
    
```

ES 2 411 907 T3

<210> 2
 <211> 129
 <212> PRT
 5 <213> *Homo sapiens*

<400> 2

```

Met Ala Arg Gly Ser Leu Arg Arg Leu Leu Arg Leu Leu Val Leu Gly
 1          5          10          15

Leu Trp Leu Ala Leu Leu Arg Ser Val Ala Gly Glu Gln Ala Pro Gly
          20          25          30

Thr Ala Pro Cys Ser Arg Gly Ser Ser Trp Ser Ala Asp Leu Asp Lys
          35          40          45

Cys Met Asp Cys Ala Ser Cys Arg Ala Arg Pro His Ser Asp Phe Cys
          50          55          60

Leu Gly Cys Ala Ala Ala Pro Pro Ala Pro Phe Arg Leu Leu Trp Pro
65          70          75          80

Ile Leu Gly Gly Ala Leu Ser Leu Thr Phe Val Leu Gly Leu Leu Ser
          85          90          95

Gly Phe Leu Val Trp Arg Arg Cys Arg Arg Arg Glu Lys Phe Thr Thr
          100          105          110

Pro Ile Glu Glu Thr Gly Gly Glu Gly Cys Pro Ala Val Ala Leu Ile
          115          120          125

Gln
  
```

10 <210> 3
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15 <400> 3

ES 2 411 907 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Glu Ile Arg Leu Lys Ser Asp Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu
 50 55 60
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
 65 70 75 80
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Thr Gly Tyr Tyr Ala Asp Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 4
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 4

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Thr Ser
 20 25 30
 Ser Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
 35 40 45
 Lys Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80
 Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Trp
 85 90 95
 Glu Ile Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

10

<210> 5
 <211> 119
 <212> PRT

ES 2 411 907 T3

<213> *Mus musculus*

<400> 5

Glu Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Met Lys Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Glu Ile Arg Leu Lys Ser Asp Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu
 50 55 60
 Ser Val Lys Gly Lys Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Arg
 65 70 75 80
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Gly Ile Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Thr Gly Tyr Tyr Ala Asp Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115

5

<210> 6

<211> 111

<212> PRT

10 <213> *Mus musculus*

<400> 6

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Thr Ser
 20 25 30
 Ser Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45
 Lys Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
 65 70 75 80
 Pro Val Glu Glu Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Trp
 85 90 95
 Glu Ile Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

15 <210> 7

<211> 119

ES 2 411 907 T3

<212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 7

Glu Val Lys Leu Gly Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Met Lys Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Pro Phe Thr Lys Tyr
 20 25 30
 Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Glu Ile Arg Leu Lys Ser Asp Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu
 50 55 60
 Ser Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Arg Ser Ser
 65 70 75 80
 Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Ile Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Ser Pro Thr Tyr Ala Asp Thr Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115

5

<210> 8
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

10

<400> 8

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Thr Ser
 20 25 30
 Thr Tyr Ser Tyr Met Gln Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro
 35 40 45
 Lys Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro Ala
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
 65 70 75 80
 Pro Val Glu Glu Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Trp
 85 90 95
 Glu Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105 110

15 <210> 9

ES 2 411 907 T3

<211> 119
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

5 <400> 9

Glu Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Met Lys Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asn Tyr
 20 25 30
 Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Leu
 35 40 45
 Ala Glu Ile Arg Leu Lys Ser Asp Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu
 50 55 60
 Ser Val Lys Gly Lys Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Arg
 65 70 75 80
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asn Thr Gly Ile Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Thr Gly Gly Phe Ala Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115

<210> 10
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

10

<400> 105

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Thr Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Thr Ser
 20 25 30
 Ser Tyr Ser Tyr Met Gln Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45
 Lys Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Thr Asn Leu Asp Ser Gly Val Pro Ala
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
 65 70 75 80
 Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Trp
 85 90 95
 Glu Ile Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105 110

15

ES 2 411 907 T3

<210> 11
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 11

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Phe
 20 25 30
 Ile Ile Ala Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Glu Ile Tyr Pro Gly Thr Gly Arg Thr Tyr Tyr Ser Glu Lys Phe
 50 55 60
 Arg Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Arg Thr Ile Tyr Tyr Asp Tyr Asp Gly Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 12
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10

<400> 12

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30
 Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Ser Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ala His Asn
 85 90 95
 Leu Glu Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

15

<210> 13
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 5
 <400> 13
 Ser Tyr Trp Met Ser
 1 5

 <210> 14
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

 <400> 14
 Ser Tyr Trp Met Ser
 1 5
 15

 <210> 15
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 20

 <400> 15
 Asn Tyr Trp Met Ser
 1 5

 <210> 16
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 25

 <400> 16
 Lys Tyr Trp Met Asn
 1 5

 <210> 17
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 30

 <400> 17
 Arg Tyr Trp Met Ser
 1 5
 35

 <210> 18
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 40

 <400> 18
 Asn Tyr Trp Met Asn
 1 5
 45

 <210> 19
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 50

 <400> 19

ES 2 411 907 T3

Glu Ile Arg Leu Lys Ser Asp Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu Ser
1 5 10 15

Val Lys Gly

5 <210> 20
<211> 19
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 20
Glu Ile Arg Leu Lys Ser Asp Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu Ser
1 5 10 15

Val Lys Gly

10 <210> 21
<211> 19
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

15 <400> 21
Glu Ile Arg Leu Lys Ser Asp Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu Ser
1 5 10 15

Val Lys Gly

20 <210> 22
<211> 19
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 22
Glu Ile Arg Leu Lys Ser Asp Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu Ser
1 5 10 15

Ala Lys Gly

25 <210> 23
<211> 20
<212> PRT
30 <213> *Mus musculus*

<400> 23
Glu Ile Arg Val Lys Ser Asp Asn Tyr Ala Thr Thr His Tyr Ala Glu
1 5 10 15

Ser Val Lys Gly
20

35 <210> 24
<211> 19
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

ES 2 411 907 T3

<400> 24

Glu Ile Arg Leu Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu Ser
 1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 25

5 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 105

10 Tyr Tyr Ala Asp Ala Met Asp Tyr
 1 5

<210> 26

15 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 26

20 Tyr Tyr Ala Asp Ala Met Asp Tyr
 1 5

<210> 27

25 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 27

30 Gly Phe Ala Asp Tyr Phe Asp Tyr
 1 5

<210> 28

35 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 28

40 Thr Tyr Ala Asp Thr Met Asp Tyr
 1 5

<210> 29

45 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 29

50 Tyr Tyr Ala Asp Ala Met Asp Tyr
 1 5

<210> 30

<211> 8
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 30

Ala Tyr Ala Asp Tyr Phe Asp Tyr
 1 5

ES 2 411 907 T3

<210> 31
 <211> 30
 <212> PRT
 5 <213> *Homo sapiens*

 <400> 105
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
 20 25 30

 10 <210> 32
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 15 <400> 32
 Glu Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

 Ser Met Lys Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
 20 25 30

 <210> 33
 <211> 30
 <212> PRT
 20 <213> *Mus musculus*

 <400> 33
 Glu Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

 Ser Met Lys Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser

 20 25 30

 25 <210> 34
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

 30 <400> 34
 Glu Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

 Ser Met Lys Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn
 20 25 30

 <210> 35
 <211> 30
 <212> PRT
 35 <213> *Mus musculus*

ES 2 411 907 T3

<400> 35

Glu Val Lys Leu Gly Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Met Lys Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Pro Phe Thr
 20 25 30

<210> 36

5 <211> 30

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 36

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Pro Phe Thr
 20 25 30

10

<210> 37

<211> 30

<212> PRT

15 <213> *Homo sapiens*

<400> 37

Glu Val Lys Leu Gly Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Met Lys Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
 20 25 30

20

<210> 38

<211> 30

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

25

<400> 38

Glu Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Met Lys Leu Ser Cys Val Val Ser Gly Leu Thr Phe Ser
 20 25 30

30

<210> 39

<211> 30

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 105

Glu Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Met Lys Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser
 20 25 30

35

ES 2 411 907 T3

<210> 40
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 5
 <400> 40
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala
 1 5 10

 <210> 41
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 <400> 41
 Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala
 1 5 10
 15

 <210> 42
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

 <400> 42
 Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala
 1 5 10
 20

 <210> 43
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

 <400> 43
 Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Leu Ala
 1 5 10
 25

 <210> 44
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

 <400> 44
 Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala
 1 5 10
 30

 <210> 45
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 <400> 45
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala
 1 5 10
 35

 <210> 46
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 <400> 46

ES 2 411 907 T3

Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser
 1 5 10

<210> 47
 <211> 14
 5 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 47
 Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala
 1 5 10

10 <210> 48
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

15 <400> 48
 Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala
 1 5 10

20 <210> 49
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 49
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln
 1 5 10 15

25 Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Gly
 20 25 30

30 <210> 50
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 50
 Lys Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Ser Arg Leu Tyr Leu Gln
 1 5 10 15

35 Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Gly Ile Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

40 <210> 51
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 51
 Lys Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Arg Leu Tyr Leu Gln
 1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Gly Ile Tyr Tyr Cys Thr Gly
 20 25 30

ES 2 411 907 T3

<210> 52
 <211> 32
 <212> PRT
 5 <213> *Mus musculus*

 <400> 52
 Lys Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Arg Leu Tyr Leu Gln
 1 5 10 15

 Met Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asn Thr Gly Ile Tyr Tyr Cys Thr Gly
 20 25 30

 10 <210> 53
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

 15 <400> 53
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Arg Ser Ser Val Tyr Leu Gln
 1 5 10 15

 Met Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ser Pro
 20 25 30

 <210> 54
 <211> 32
 20 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 <400> 105
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln
 1 5 10 15

 Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Pro
 20 25 30

 25
 <210> 55
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 30 <400> 55
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Arg Ser Ser Leu Tyr Leu Gln
 1 5 10 15

 Met Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

 35 <210> 56
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

 <400> 56

ES 2 411 907 T3

Lys Phe Thr Val Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Arg Leu Tyr Leu Gln

1 5 10 15

Met Ser Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Ile Tyr Tyr Cys Ile Gly
20 25 30

<210> 57

<211> 32

5 <212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 57

Arg Phe Thr Ile Ser Arg His Asp Ser Lys Ser Ser Val Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Thr Gly Ile Tyr Tyr Cys Thr Arg
20 25 30

10

<210> 58

<211> 11

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

15

<400> 105

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 59

20

<211> 11

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 59

Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

25

<210> 60

<211> 11

<212> PRT

30

<213> *Mus musculus*

<400> 60

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
1 5 10

35

<210> 61

<211> 11

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

40

<400> 61

Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 62

ES 2 411 907 T3

<211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 5 <400> 62
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10
 <210> 63
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 63
 Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10
 15 <210> 64
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 20 <400> 64
 Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10
 <210> 65
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 25 <400> 65
 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 1 5 10
 30 <210> 66
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 66
 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Thr Ser Ser Tyr Ser Tyr Met His
 1 5 10 15
 35 <210> 67
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 67
 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Thr Ser Ser Tyr Ser Tyr Met His
 1 5 10 15
 40 <210> 68
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 68

ES 2 411 907 T3

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Thr Ser Ser Tyr Ser Tyr Met Gln
 1 5 10 15

 <210> 69
 <211> 15
 5 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

 <400> 69
 Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Thr Ser Thr Tyr Ser Tyr Met Gln
 1 5 10 15
 10
 <210> 70
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 15
 <400> 70
 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Thr Ser Ser Tyr Ser Tyr Met His
 1 5 10 15
 20
 <210> 71
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

 <400> 71
 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Thr Ser Thr Tyr Ser Tyr Met His
 25 1 5 10 15

 <210> 72
 <211> 7
 <212> PRT
 30 <213> *Homo sapiens*

 <400> 72
 Tyr Ala Ser Asn Leu Glu Ser
 1 5
 35
 <210> 73
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 40
 <400> 73
 Tyr Ala Ser Asn Leu Glu Ser
 1 5

 <210> 74
 <211> 7
 45 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

 <400> 74
 Tyr Ala Thr Asn Leu Asp Ser
 1 5
 50
 <210> 75
 <211> 7
 <212> PRT

<213> *Mus musculus*
 <400> 105
 Tyr Ala Ser Lys Leu Asp Ser
 1 5
 5
 <210> 76
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 10
 <400> 76
 Tyr Ala Ser Lys Leu Asp Ser
 1 5
 15
 <210> 77
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 20
 <400> 77
 Tyr Ala Ser Asn Leu Glu Ser
 1 5
 25
 <210> 78
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 30
 <400> 78
 Gln His Ser Trp Glu Ile Pro Tyr Thr
 1 5
 35
 <210> 79
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 40
 <400> 79
 Gln His Ser Trp Glu Ile Pro Tyr Thr
 1 5
 45
 <210> 80
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 50
 <400> 80
 Gln His Ser Trp Glu Ile Pro Tyr Thr
 1 5
 55
 <210> 81
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 60
 <400> 105
 Gln His Ser Trp Glu Leu Pro Tyr Thr
 1 5

ES 2 411 907 T3

<210> 82
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 5
 <400> 82
 Gln His Ser Trp Glu Ile Pro Trp Thr
 1 5
 <210> 83
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 83
 Gln His Ser Trp Glu Ile Pro Tyr Thr
 15 1 5
 <210> 84
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 84
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
 20
 <210> 85
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 85
 Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys
 20
 <210> 86
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 86
 Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys
 20
 <210> 87
 <211> 23
 <212> PRT
 40

ES 2 411 907 T3

<213> *Mus musculus*

<400> 87

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Thr Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys
20

5

<210> 88

<211> 23

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

10

<400> 88

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys
20

15

<210> 89

<211> 23

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 89

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys
20

20

<210> 90

<211> 23

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

25

<400> 105

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys
20

30

<210> 91

<211> 23

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

35

<400> 91

ES 2 411 907 T3

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Val Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys
 20

5 <210> 92
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 92
 Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Val Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys
 20

10 <210> 93
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15 <400> 93
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Lys
 1 5 10 15

20 <210> 94
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

25 <400> 94
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

30 <210> 95
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 95
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Lys
 1 5 10 15

35 <210> 96
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

40 <400> 96
 Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Lys
 1 5 10 15

45 <210> 97
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

ES 2 411 907 T3

<400> 97

Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Lys
 1 5 10 15

5 <210> 98
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 98

Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Lys
 1 5 10 15

15 <210> 99
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 99

Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

20 <210> 100
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

25 <400> 100

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Lys
 1 5 10 15

30 <210> 101
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 101

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Ile Leu Ile Lys
 1 5 10 15

35 <210> 102
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

40 <400> 102

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
 20 25 30

45 <210> 103
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 103

ES 2 411 907 T3

Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15

Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 104
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

5

<400> 104
 Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15

Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
 20 25 30

10

<210> 105
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

15

<400> 105
 Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15

Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
 20 25 30

20

<210> 106
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 106
 Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

1 5 10 15

Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
 20 25 30

25

<210> 107
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

30

<400> 107

ES 2 411 907 T3

Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 108
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 108
 Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15

Leu Asn Ile His Pro Val Gln Glu Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 109
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 105
 Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15

Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 110
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 110
 Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15

Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 111
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 111
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 1 5 10

<210> 112
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 112
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
1 5 10

5 <210> 113
<211> 11
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 113
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
1 5 10

10 <210> 114
<211> 11
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

15 <400> 105
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
1 5 10

20 <210> 115
<211> 11
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

25 <400> 115
Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg
1 5 10

30 <210> 116
<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 116
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
1 5 10

35 <210> 117
<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

40 <400> 117
Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg
1 5 10

45 <210> 118
<211> 11
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 118
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Met Glu Ile Lys Arg
1 5 10

50 <210> 119

<211> 11
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

5 <400> 119
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 1 5 10

<210> 120
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

10

<220>
 <221> característica diversa
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

15

<220>
 <221> característica diversa
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

20

<400> 120
 Xaa Tyr Trp Met Xaa
 1 5

25

<210> 121
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

30

<220>
 <221> característica diversa
 <222> (17)..(17)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

35

<400> 121
 Glu Ile Arg Leu Lys Ser Asp Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu Ser
 1 5 10 15

Xaa Lys Gly

40

<210> 122
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

45

<220>
 <221> característica diversa
 <222> (1)..(2)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

50

<220>
 <221> característica diversa
 <222> (5)..(6)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 122
 Xaa Xaa Ala Asp Xaa Xaa Asp Tyr
 1 5

55

<210> 123
 <211> 30
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Construcción sintética

 10 <220>
 <221> característica diversa
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

 15 <220>
 <221> característica diversa
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

 20 <220>
 <221> característica diversa
 <222> (18)..(19)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

 25 <220>
 <221> característica diversa
 <222> (23)..(23)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

 30 <220>
 <221> característica diversa
 <222> (28)..(28)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

 35 <220>
 <221> característica diversa
 <222> (30)..(30)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

 40 <400> 123
 Glu Val Xaa Leu Xaa Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

 Ser Xaa Xaa Leu Ser Cys Xaa Ala Ser Gly Phe Xaa Phe Xaa
 20 25 30

 <210> 124
 <211> 14
 45 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Construcción sintética

 50 <220>
 <221> característica diversa
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

 55 <220>
 <221> característica diversa
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

 60

<220>
 <221> característica diversa
 <222> (13)..(13)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 5
 <400> 124
 Trp Val Arg Gln Xaa Pro Xaa Lys Gly Leu Glu Trp Xaa Ala
 1 5 10

 <210> 125
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 10

 <220>
 <223> Construcción sintética
 15

 <220>
 <221> característica diversa
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 20

 <220>
 <221> característica diversa
 <222> (8)..(13)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 25

 <220>
 <221> característica diversa
 <222> (19)..(19)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 30

 <220>
 <221> característica diversa
 <222> (24)..(24)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 35

 <220>
 <221> característica diversa
 <222> (26)..(27)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 40

 <220>
 <221> característica diversa
 <222> (31)..(32)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 45

 <400> 125
 Xaa Phe Thr Ile Ser Arg Asp Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr Leu Gln
 1 5 10 15

 Met Asn Xaa Leu Arg Ala Glu Xaa Thr Xaa Xaa Tyr Tyr Cys Xaa Xaa
 20 25 30

 <210> 126
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 50

 <220>
 <223> Construcción sintética
 55

- 5
 <220>
 <221> característica diversa
 <222> (6)..(7)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- <400> 126
 Trp Gly Gln Gly Thr Xaa Xaa Thr Val Ser Ser
 1 5 10
- 10
 <210> 127
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
- 15
 <220>
 <221> característica diversa
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- 20
 <220>
 <221> característica diversa
 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- 25
 <220>
 <221> característica diversa
 <222> (15)..(15)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- <400> 127
 Xaa Ala Ser Gln Ser Val Ser Thr Ser Xaa Tyr Ser Tyr Met Xaa
 1 5 10 15
- 30
 <210> 128
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
- 35
 <220>
 <221> característica diversa
 <222> (3)..(4)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- 40
 <220>
 <221> característica diversa
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- 45
 <400> 128
 Tyr Ala Xaa Xaa Leu Xaa Ser
 1 5
- 50
 <210> 129
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
- 55
 <220>
 <221> característica diversa
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 129
 Gln His Ser Trp Glu Xaa Pro Tyr Thr
 1 5

5 <210> 130
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Construcción sintética

15 <220>
 <221> característica diversa
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

20 <220>
 <221> característica diversa
 <222> (3)..(4)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

25 <220>
 <221> característica diversa
 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

30 <220>
 <221> característica diversa
 <222> (12)..(13)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

35 <220>
 <221> característica diversa
 <222> (15)..(15)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

40 <220>
 <221> característica diversa
 <222> (17)..(17)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

45 <220>
 <221> característica diversa
 <222> (19)..(19)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

50 <220>
 <221> característica diversa
 <222> (22)..(22)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 130
 Xaa Ile Xaa Xaa Thr Gln Ser Pro Xaa Ser Leu Xaa Xaa Ser Xaa Gly
 1 5 10 15

Xaa Arg Xaa Thr Ile Xaa Cys
 20

55 <210> 131
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción sintética

5 <220>
 <221> característica diversa
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

10 <220>
 <221> característica diversa
 <222> (8)..(9)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

15 <400> 131
 Trp Tyr Gln Gln Xaa Pro Gly Xaa Xaa Pro Lys Leu Leu Ile Lys
 1 5 10 15

<210> 132
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción sintética

25 <220>
 <221 > característica diversa
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

30 <220>
 <221> característica diversa
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

35 <220>
 <221> característica diversa
 <222> (18)..(18)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

40 <220>
 <221> característica diversa
 <222> (20)..(24)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

45 <220>
 <221> característica diversa
 <222> (27)..(27)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

50 <220>
 <221> característica diversa
 <222> (29)..(29)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

55 <400> 132
 Gly Xaa Pro Xaa Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15
 Leu Xaa Ile Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Glu Asp Xaa Ala Xaa Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 133
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
5
<220>
<223> Construcción sintética

<220>
10 <221> característica diversa
<222> (3)..(3)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>
15 <221> característica diversa
<222> (6)..(7)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 133
Phe Gly Xaa Gly Thr Xaa Xaa Glu Ile Lys Arg
1 5 10
20

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo anti-Tweak-R aislado o un fragmento de unión a antígeno del mismo,
- 5 en el que dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno puede inhibir o prevenir el crecimiento de un tumor sólido que expresa SEC ID nº: 2, en el que además dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende:
- 10 una CDR1 de cadena pesada codificada por una secuencia de aminoácidos que comprende la fórmula XaaYWMXaa (SEC ID nº 120), en la que Xaa en la posición 1 es S, N, o K y Xaa en la posición 5 es S o N;
- una CDR2 de cadena pesada codificada por una secuencia de aminoácidos que comprende la fórmula EIRLKSDNYATHYAESXaaKG (SEC ID nº 121), en la que Xaa en la posición 17 es A o V;
- 15 una CDR3 de cadena pesada codificada por una secuencia de aminoácidos que comprende la fórmula XaaXaaADXaaXaaDY (SEC ID nº 122), en la que Xaa en la posición 1 es G, T, o Y, Xaa en la posición 2 es F o Y, Xaa en la posición 5 es A, T, o Y, y Xaa en la posición 6 es F o M;
- 20 una CDR1 de cadena ligera codificada por una secuencia de aminoácidos que comprende la fórmula XaaASQSVSTXaaYSYMXaa (SEC ID nº 127), en la que Xaa en la posición 1 es R o K, Xaa en la posición 10 es S o T y Xaa en la posición 15 es H o Q;
- 25 una CDR2 de cadena ligera codificada por una secuencia de aminoácidos que comprende la fórmula YAXaaXaaLXaaS (SEC ID nº 128), en la que Xaa en la posición 3 es S o T, Xaa en la posición 4 es N o K, Xaa en la posición 6 es E o D; y,
- una CDR3 de cadena ligera codificada por una secuencia de aminoácidos que comprende la fórmula QHSWEXaaPYT (SEC ID nº 129), en la que Xaa en la posición 6 es I o L.
- 30 2. Anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo según la reivindicación 1, que comprende, bien sea:
- (i) una región V_H que comprende SEC ID nº:3 y una región V_L que comprende SEC ID nº:4;
- (ii) una región V_H que comprende SEC ID nº:5 y una región V_L que comprende SEC ID nº:6;
- 35 (iii) una región V_H que comprende SEC ID nº:7 y una región V_L que comprende SEC ID nº:8; o
- (iv) una región V_H que comprende SEC ID nº:9 y una región V_L que comprende SEC ID nº:10.
3. Anticuerpo aislado según la reivindicación 1 o 2, en el que dicho anticuerpo es de isotipo IgG1 humano o de ratón.
- 40 4. Anticuerpo anti-TweakR aislado o un fragmento de unión a antígeno del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho anticuerpo aislado es un anticuerpo monoclonal.
5. Anticuerpo anti-TweakR aislado o un fragmento de unión a antígeno del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho anticuerpo aislado es un anticuerpo humanizado.
- 45 6. Compuesto conjugado que comprende un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, enlazado a un resto efector.
7. Compuesto conjugado según la reivindicación 6, en el que el resto efector es un resto marcador.
- 50 8. Compuesto conjugado según la reivindicación 7, en el que el resto marcador es un marcador radioactivo, un marcador fluorescente o una enzima.
9. Compuesto conjugado según la reivindicación 6, en el que el resto efector es un resto terapéutico.
- 55 10. Compuesto conjugado según la reivindicación 9, en el que el resto efector terapéutico es un agente citotóxico.
11. Compuesto conjugado según la reivindicación 10, en el que el agente citotóxico es una toxina, un agente quimioterapéutico o un radioisótopo.
- 60 12. Composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
13. Anticuerpo o fragmento de unión a antígeno tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para su uso en terapia.
- 65

14. Anticuerpo o fragmento de unión a antígeno según la reivindicación 1 a 5 para uso para el tratamiento de un tumor sólido en un sujeto.

5 15. Anticuerpo o fragmento de unión a antígeno según la reivindicación 14, o uso según la reivindicación 14, en combinación con un agente terapéutico seleccionado de entre el grupo constituido por agentes dirigidos contra dianas, agentes quimioterapéuticos convencionales, y agentes de terapia hormonal.

10 16. Anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 14, o uso según la reivindicación 14, en el que el tumor sólido se selecciona de entre el grupo constituido por cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer pulmonar, melanoma, cáncer pancreático, cáncer ovárico, cáncer renal, cáncer de cabeza y cuello, cáncer esofágico, cáncer uterino, cáncer de esófago, cáncer cervical, glioblastoma, y sarcomas.

15 17. Anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 16, o uso según la reivindicación 16, en el que el tumor sólido es cáncer colorrectal, cáncer pancreático, o cáncer de mama.

(SEC ID n° 1)

```

tcgacccacg cgtccgccc cgcgctccgc cacgcgctccg ggcgcaggac gtgcactatg
gctcggggct cgctgcgccg gttgctgcgg ctctcctgtc tggggctctg gctggcggtg
ctgcgctccg tggccgggga gcaagcgcga ggcaccgcc cctgctccc cggcagctcc
tggagcgcgg acctggacaa gtgcatggac tgcgcgtctt gcagggcgcg accgcacagc
gacttctgcc tgggctgcgc tgcagcacct cctgccccct tccggctgct ttggcccac
cttgggggcg ctctgagcct gaccttcgtg ctggggctgc tttctggctt tttggtctgg
agacgatgcc gcaggagaga gaagtccacc acccccatag aggagaccgg cggagagggc
tgcccagctg tggcgtgat ccagtgacaa tgtgccccct gccagccggg gctcggcccac
tcatcattca ttcattcatt ctagagccag tctctgcctc ccagacgcgg cgggagccaa
gctcctccac cacaaggggg gtggggggcg gtgaatcacc tctgaggcct gggcccaggg
ttcaggggaa ccttccaagg tgtctggttg cctgcctct ggctccagaa cagaaaggga
gcctcacgct ggctcacaca aaacagctga cactgactaa ggaactgcag catttgca
ggggaggggg gtgcccctct tctagagggc cctggggggc aggctgactt ggggggcaga
cttgacacta ggccccactc actcagatgt cctgaaattc caccacgggg gtcaccctgg
ggggttaggg acctatTTTT aactaggg ggctggocca ctaggagggc tggccctaag
atacagacc ccccaactcc ccaaagcggg gaggagatat ttatTTTggg gagagTTTgg
aggggagggg gaatttatta ataaaagaat ctttaacttt aaaaaaaaaa aaaaaaagg
gcggccgctc tagaggatcc ctc
    
```

FIG. 1A

5 (SEC ID n° 2)

```

Met Ala Arg Gly Ser Leu Arg Arg Leu Leu Arg Leu Leu Val Leu Gly
Leu Trp Leu Ala Leu Leu Arg Ser Val Ala Gly Glu Gln Ala Pro Gly
Thr Ala Pro Cys Ser Arg Gly Ser Ser Trp Ser Ala Asp Leu Asp Lys
Cys Met Asp Cys Ala Ser Cys Arg Ala Arg Pro His Ser Asp Phe Cys
Leu Gly Cys Ala Ala Ala Pro Pro Ala Pro Phe Arg Leu Leu Trp Pro
Ile Leu Gly Gly Ala Leu Ser Leu Thr Phe Val Leu Gly Leu Leu Ser
Gly Phe Leu Val Trp Arg Arg Cys Arg Arg Arg Glu Lys Phe Thr Thr
Pro Ile Glu Glu Thr Gly Gly Glu Gly Cys Pro Ala Val Ala Leu Ile
Gln
    
```

FIG. 1B

VH (SEC ID n° 3)
 (FR1) (CDR1) (FR2) (CDR2)
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SYWMS WVRQAPGKGLEWVA EIRLKSDNYATHYAESVKG
 (FR3) (CDR3) (FR4)
 RFTISRDDSKNSLYLQMNLSLRAEDTAVYYCTG YYADAMDY WGQGTLVTVSS
 VL (SEC ID n° 4)
 (FR1) (CDR1) (FR2) (CDR2)
 DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITC RASQSVSTSSYSYMH WYQQKPKAPKLLIK YASNLES
 (FR3) (CDR3) (FR4)
 GVPFRFSGSGGTDFTLTISSLPEDFATYYC QHSWEIPLYT FGGGTKVEIK

FIG. 2A

VH (SEC ID n° 5)
 (FR1) (CDR1) (FR2) (CDR2)
 EVKLEESGGGLVQPGGSMKLSCVASGFTFS SYWMS WVRQSPEKGLEWVA EIRLKSDNYATHYAESVKG
 (FR3) (CDR3) (FR4)
 KFTISRDDSKRSRLYLQMNLSLRAEDTGIYYCTG YYADAMDY WGQGTSTVTVSS
 VL (SEC ID n° 6)
 (FR1) (CDR1) (FR2) (CDR2)
 DIVLTQSPASLAVSLGQRATISC RASQSVSTSSYSYMH WYQQKPGQPPKLLIK YASNLES
 (FR3) (CDR3) (FR4)
 GVPARFSGSGGTDFTLNIHPVEEEDTATYYC QHSWEIPLYT FGGGTKLEIK

FIG. 2B

VH (SEC ID n° 7)
 (FR1) (CDR1) (FR2) (CDR2)
 EVKLGESGGGLVQPGGSMKLSCVASGFPFT KYWMN WVRQSPKGLEWVA EIRLKSDNYATHYAESAKG
 (FR3) (CDR3) (FR4)
 RFTISRDDSRSSVYLQMNHLRAEDTAIYYCSP TYADTMDY WGQGTSVTVSS
 VL (SEC ID n° 8)
 (FR1) (CDR1) (FR2) (CDR2)
 DIVLTQSPASLAVSLGQRATISC KASQSVSTSYSYMQ WYQORPGQSPKLLIK YASKLDS
 (FR3) (CDR3) (FR4)
 GVPARFSGSGGTDFTLNHPVEEEDTAIYYC QHSWELPYT FGGGTRLEIKR

FIG. 2C

VH (SEC ID n° 9)
 (FR1) (CDR1) (FR2) (CDR2)
 EVKLEESGGGLVQPGGSMKLSCVASGFTFN NYWMS WVRQSPKGLEWLA EIRLKSDNYATHYAESVKG
 (FR3) (CDR3) (FR4)
 KFTISRDDSKSRLLYLQMNHLRAENTGIYYCTG GFADYFDY WGQGTTLTVSS
 VL (SEC ID n° 10)
 (FR1) (CDR1) (FR2) (CDR2)
 DIVLTQSPASLTVSLGQRATISC RASQSVSTSSYSYMQ WYQORFGQPPKLLIK YATNLDS
 (FR3) (CDR3) (FR4)
 GVPARFSGSGGTDFTLNHPVEEEDAATYYC QHSWEIPYT FGGGTKLEIKR

FIG. 2D

VH (SEC ID n° 11)

(FR1)	(CDR1)	(FR2)	(CDR2)
QVQLVQSGAEVKKPGASVKISKCKVSGYTFT	DFIIA	WVKQAPGKLEWIG	EIYPGTRTYSEKFRG
(FR3)	(CDR3)	(FR4)	
KATLTADKSTSFAYMELSSLRSEDTAVYYCAR	RTIYYDYDGDY	WGQGTITVTVSS	

VL (SEC ID n° 12)

(FR1)	(CDR1)	(FR2)	(CDR2)
DIVMTQSPFLSLPVTGPEPASISC	RSSKSLHSHNGITYLY	WYLQKPGQSPQLLIY	QMSNLIAS
(FR3)	(CDR3)	(FR4)	
GVPDRFSSSGGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC	AHNLELPWT	FGGKTKVEIK	

FIG. 2E

Cadena pesada: CDR1

PDL192	SYWMS	SEC ID nº 13
19.2.1	SYWMS	SEC ID nº 14
136.1	NYWMS	SEC ID nº 15
18.3.3	KYWMS	SEC ID nº 16
ITEM-3	RYWMS	SEC ID nº 17
ITEM-1	NYWMN	SEC ID nº 18

FIG 3A

5

Cadena pesada: CDR2

PDL192	EIRLKSDNYAT-HYAESVKG	SEC ID nº 19
19.2.1	EIRLKSDNYAT-HYAESVKG	SEC ID nº 20
136.1	EIRLKSDNYAT-HYAESVKG	SEC ID nº 21
18.3.3	EIRLKSDNYAT-HYAESAAG	SEC ID nº 22
ITEM-3	EIRVKSNDYATTHYAESVKG	SEC ID nº 23
ITEM-1	EIRLKSNNYAT-HYAESVKG	SEC ID nº 24

FIG 3B

10

Cadena pesada: CDR3

PDL192	YYADAMDY	SEC ID nº 25
19.2.1	YYADAMDY	SEC ID nº 26
136.1	GFADYFDY	SEC ID nº 27
18.3.3	TYADTMDY	SEC ID nº 28
ITEM-3	YYADAMDY	SEC ID nº 29
ITEM-1	AYADYFDY	SEC ID nº 30

FIG 3C

15

Cadena pesada: FR1

PDL192	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	SEC ID nº 31
PDL192-2	EVKLEESGGGLVOPGGSMKLSCVASGFTFS	SEC ID nº 32
19.2.1	EVKLEESGGGLVQPGGSMKLSCVASGFTFS	SEC ID nº 33
.136 .1	EVKLEESGGGLVQPGGSMKLSCVASGFTFN	SEC ID nº 34
18.3.3	EVKLGESGGGLVQPGGSMKLSCVASGFPFT	SEC ID nº 35
PDL183	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFPFT	SEC ID nº 36
PDL183-2	EVKLGESGGGLVQPGGSMKLSCVASGFTFS	SEC ID nº 37
ITEM-3	EVKLEESGGGLVQPGGSMKLSCVVSGLTFS	SEC ID nº 38
ITEM-1	EVKLEESGGGLVQPGGSMKLSCVASGFSFS	SEC ID nº 39

FIG 3D

20

Cadena pesada: FR2

PDL192	WVRQAPGKGLEWVA	SEC ID nº 40
PDL192-2	WVROSPEKGLEWVA	SEC ID nº 41
19.2.1	WVRQSPEKGLEWVA	SEC ID nº 42
136.1	WVRQSPEKGLEWLA	SEC ID nº 43
18.3.3	WVRQSPEKGLEWVA	SEC ID nº 44
PDL183	WVRQAPGKGLEWVA	SEC ID nº 45
PDL183-2	WVRQSPEKGLEWVS	SEC ID nº 46
ITEM-3	WVRQSPEKGLEWVA	SEC ID nº 47
ITEM-1	WVRQSPEKGLEWVA	SEC ID nº 48

FIG 3E

5

Cadena pesada: FR3

PDL192	RFTISRDDSKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCTG	SEC ID nº 49
PDL192-2	KFTISRDNAKSRLYLQMNSLRAEDTGIYYCAR	SEC ID nº 50
19.2.1	KFTISRDDSKSRLYLQMNSLRAEDTGIYYCTG	SEC ID nº 51
136.1	KFTISRDDSKSRLYLQMNNLRAENTGIYYCTG	SEC ID nº 52
18.3.3	RFTISRDDSRSSVYLQMNNLRAEDTAIYYCSP	SEC ID nº 53
PDL183	RFTISRDDSKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCSP	SEC ID nº 54
PDL183-2	RFTISRDNARSSLYLQMNNLRAEDTAIYYCAR	SEC ID nº 55
ITEM-3	KFTVSRDDSKSRLYLOMSSLRPEDTGIYYCIG	SEC ID nº 56
ITEM-1	RFTISRHDSKSSVYLQMNNLRAEDTGIYYCTR	SEC ID nº 57

FIG 3F

10

Cadena pesada: FR4

PDL192	WGQGLTVTVSS	SEC ID nº 58
19.2.1	WGQGTSVTVSS	SEC ID nº 59
136.1	WGQGTTLTVSS	SEC ID nº 60
18.3.3	WGQGTSVTVSS	SEC ID nº 61
PDL183	WGQGLTVTVSS	SEC ID nº 62
PDL183-2	WGQGTSVTVSS	SEC ID nº 63
ITEM-3	WGQGTSVTVSS	SEC ID nº 64
ITEM-1	WGQGTTLTVSS	SEC ID nº 65

FIG 3G

15

Cadena ligera: CDR1

PDL192	RASQSVSTSSYSYMH	SEC ID nº 66
19.2.1	RASQSVSTSSYSYMH	SEC ID nº 67
136.1	RASQSVSTSSYSYMQ	SEC ID nº 68
18.3.3	KASQSVSTSTYSYMQ	SEC ID nº 69
ITEM-3	RASQSVSTSSYSYMH	SEC ID nº 70
ITEM-1	RASQSVSTSTYSYMH	SEC ID nº 71

FIG 4A

5 Cadena ligera: CDR2

PDL192	YASNLES	SEC ID nº 72
19.2.1	YASNLES	SEC ID nº 73
136.1	YATNLDS	SEC ID nº 74
18.3.3	YASKLDS	SEC ID nº 75
ITEM-3	YASKLDS	SEC ID nº 76
ITEM-1	YASNLES	SEC ID nº 77

FIG 4B

10 Cadena ligera: CDR3

PDL19 2	QHSWEIPYT	SEC ID nº 78
19.2.1	QHSWEIPYT	SEC ID nº 79
136.1	QHSWEIPYT	SEC ID nº 80
18.3.3	QHSWELPYT	SEC ID nº 81
ITEM-3	QHSWEIPWT	SEC ID nº 82
ITEM-1	QHSWEIPYT	SEC ID nº 83

FIG 4C

15 Cadena ligera: FR1

PDL192	DIQMTOSPSSLSASVGDRTITC	SEC ID nº 84
PDL192-2	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISC	SEC ID nº 85
19.2.1	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISC	SEC ID nº 86
136.1	DIVLTQSPASLTVSLGQRATISC	SEC ID nº 87
18.3.3	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISC	SEC ID nº 88
PDL183	DIVLTQSPGTLSPGERATLSC	SEC ID nº 89
PDL183-2	EIVMTQSPASLAVSLGQRATISC	SEC ID nº 90
ITEM-3	DIVLTQSPASLWVSLGQRATISC	SEC ID nº 91
ITEM-1	DIVLTQSPASLWVSLGQRATISC	SEC ID nº 92

FIG 4D

Cadena ligera: FR2

PDL192	WYQQKPGKAPKLLIK	SEC ID nº 93
PDL192-2	WYQQKPGQPPKLLIY	SEC ID nº 94
19.2.1	WYQQKPGQPPKLLIK	SEC ID nº 95
136.1	WYQQRPGQPPKLLIK	SEC ID nº 96
18.3.3	WYQQRPGQSPKLLIK	SEC ID nº 97
PDL183	WVQQKPGQAPRLLIK	SEC ID nº 98
PDL183-2	WYQQRPGQSPKLLIY	SEC ID nº 99
ITEM-3	WYQQKPGQPPKLLIK	SEC ID nº 100
ITEM-1	WYQQKPGQPPKILIK	SEC ID nº 101

FIG 4E

5

Cadena ligera: FR3

PDL192	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC	SEC ID nº 102
PDL192-2	GVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDTATYYC	SEC ID nº 103
19.2.1	GVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDTATYYC	SEC ID nº 104
136.1	GVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYC	SEC ID nº 105
18.3.3	GVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDTATYYC	SEC ID nº 106
PDL183	GVPARFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC	SEC ID nº 107
PDL183-2	GIPDRFSGSGSGTDFTLNIHPVQEEDTATYYC	SEC ID nº 108
ITEM-3	GVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDTATYYC	SEC ID nº 109
ITEM-1	GVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDTATYYC	SEC ID nº 110

FIG 4F

10

Cadena ligera: FR4

PDL192	FGGGTKVEIKR	SEC ID nº 111
PDL192-2	FGGGTKLEIKR	SEC ID nº 112
19.2.1	FGGGTKLEIKR	SEC ID nº 113
136.1	FGGGTKLEIKR	SEC ID nº 114
18 .3.3	FGGGTRLEIKR	SEC ID nº 115
PDL183	FGQGTKVEIKR	SEC ID nº 116
PDL183-2	FGGGTRLEIKR	SEC ID nº 117
ITEM-3	FGGGTKMEIKR	SEC ID nº 118
ITEM-1	FGGGTKLEIKR	SEC ID nº 119

FIG 4G

15

Secuencia de consenso para anticuerpos anti-Tweak R

CDR1 pesada variable	XYWMX (SEC ID nº 120)
CDR2 pesada variable	EIRLKSDNYATHYAESXKG (SEC ID nº 121)
CDR3 pesada variable	XXADXXDY (SEC ID nº 122)
FR1 pesada variable	EVXLXESGGGLVQPGGSSXXLSCXASGFXX (SEC ID nº 123)
FR2 pesada variable	WVRQXPXKGLEWXA (SEC ID nº 124)
FR3 pesada variable	XFTISRDXXXXXXYLQMNXLRAEXTXXYYCXX (SEC ID nº 125)
FR4 pesada variable	WGQGTXXTVSS (SEC ID nº 126)
CDR1 ligera variable	XASQSVSTXYSYMX (SEC ID nº 127)
CDR2 ligera variable	YAXLXS (SEC ID nº 128)
CDR3 ligera variable	QKSWEXPYT (SEC ID nº 129)
FR1 ligera variable	XIXXTOSPXLXXSXGXRXTIXC (SEC ID nº 130)
FR2 ligera variable	WYQQXPGXXPKLLIK (SEC ID nº 131)
FR3 ligera variable	GXPXRFSGSGSGTDFTLIXXXXXEDXAXYYC (SEC ID nº 132)
FR4 ligera variable	FGXGTXXEIKR (SEC ID nº 133)

FIG 5

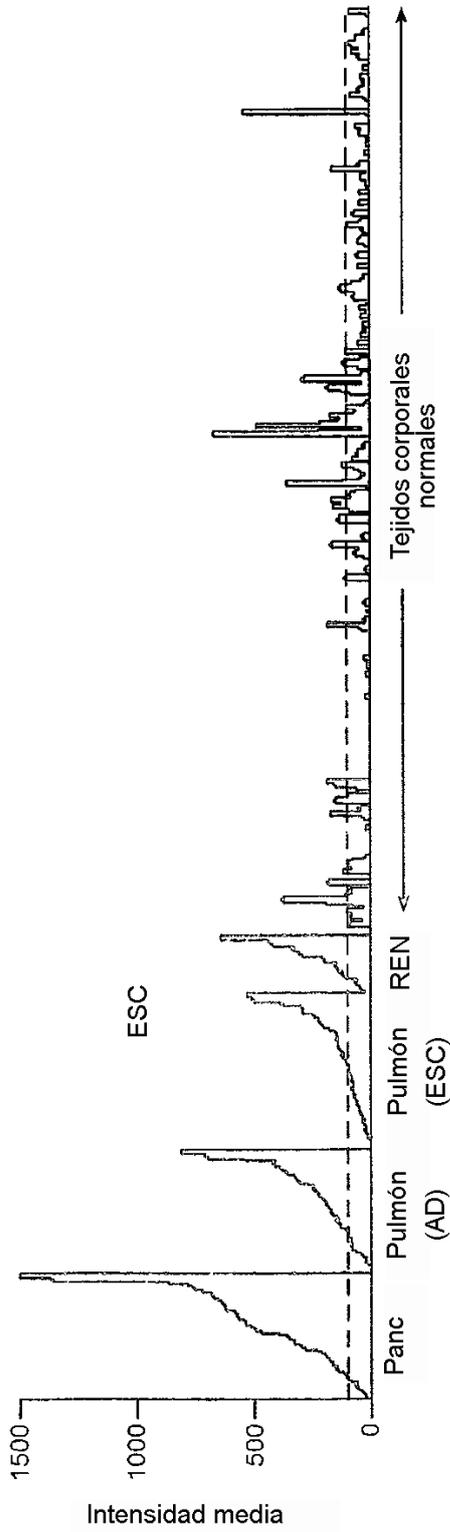
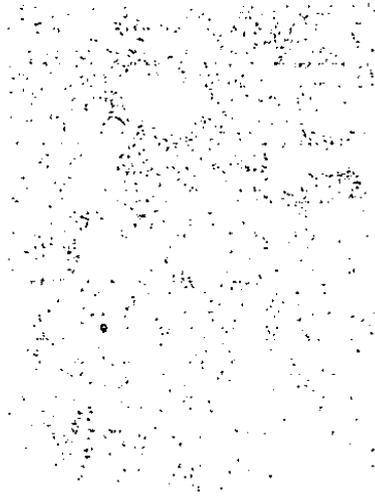


FIG. 6

FIG. 7A



Adenocarcinoma
de pulmón

FIG. 7B



Cáncer
pancreático

Carcinoma de células
escamosas del pulmón



Cáncer
pancreático

FIG. 7C



FIG. 7D

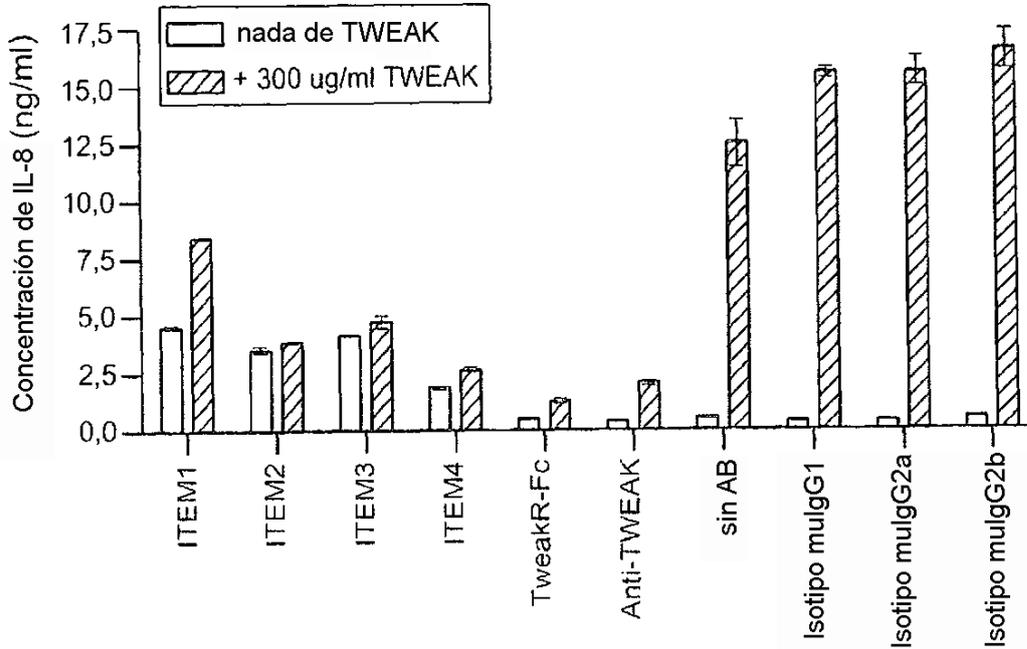


FIG. 8A

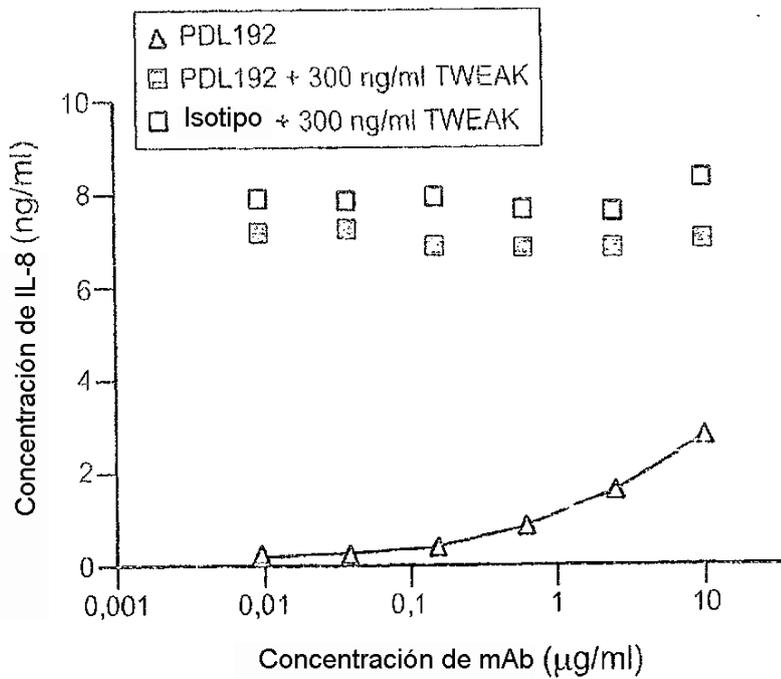


FIG. 8B

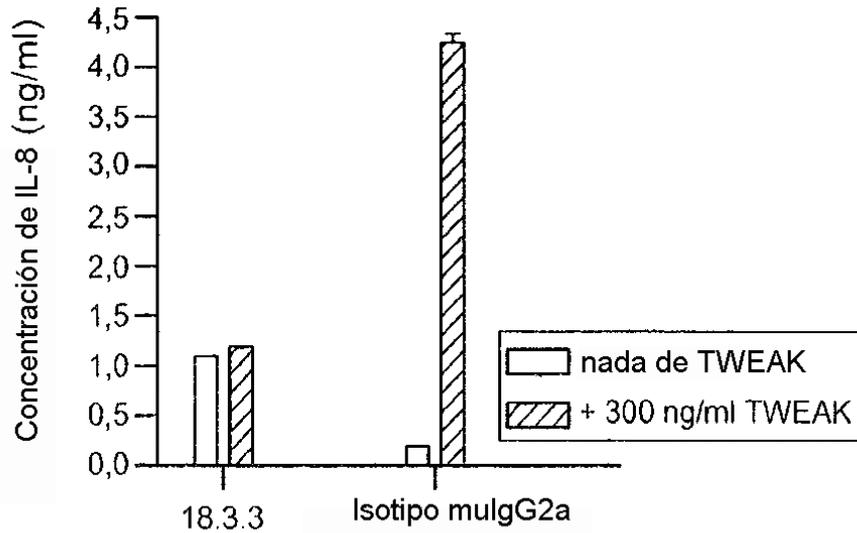


FIG. 8C

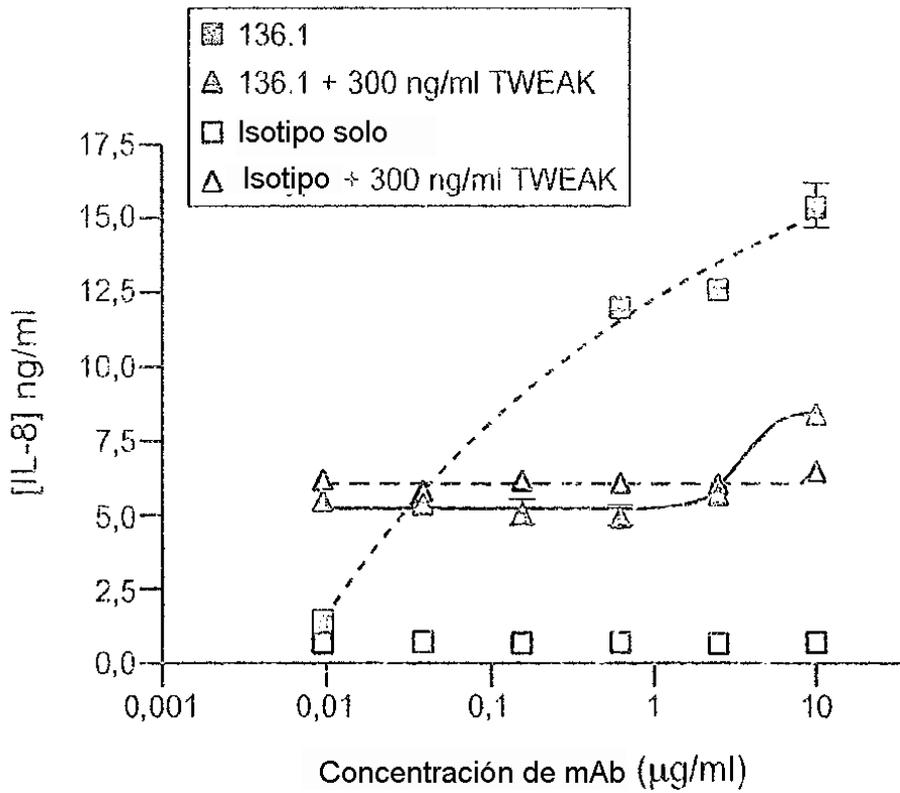


FIG. 8D

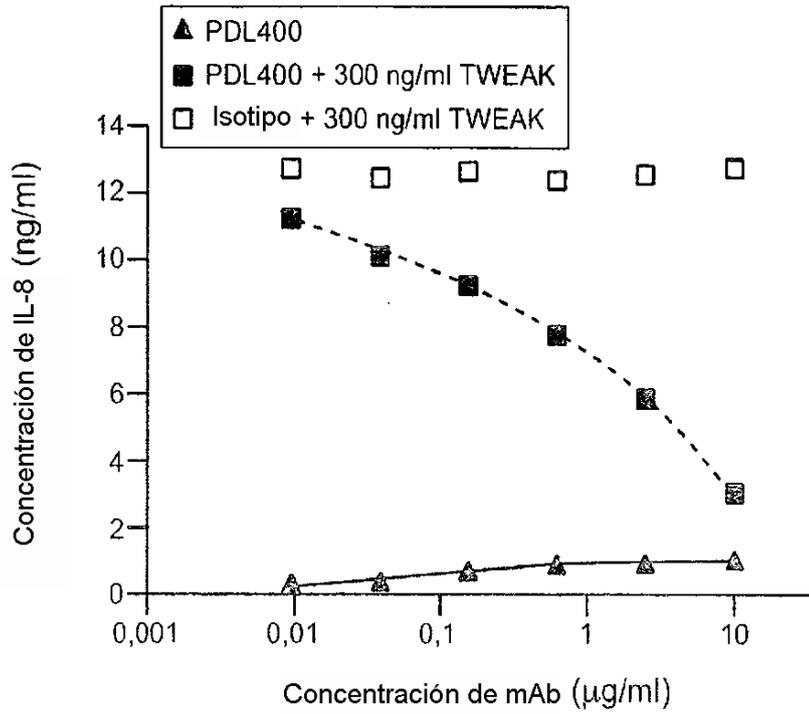


FIG. 8E

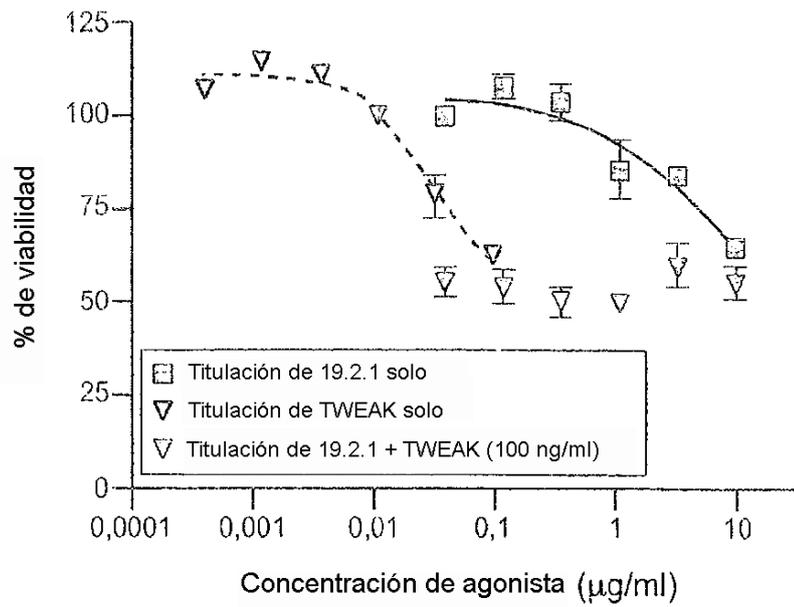


FIG. 9

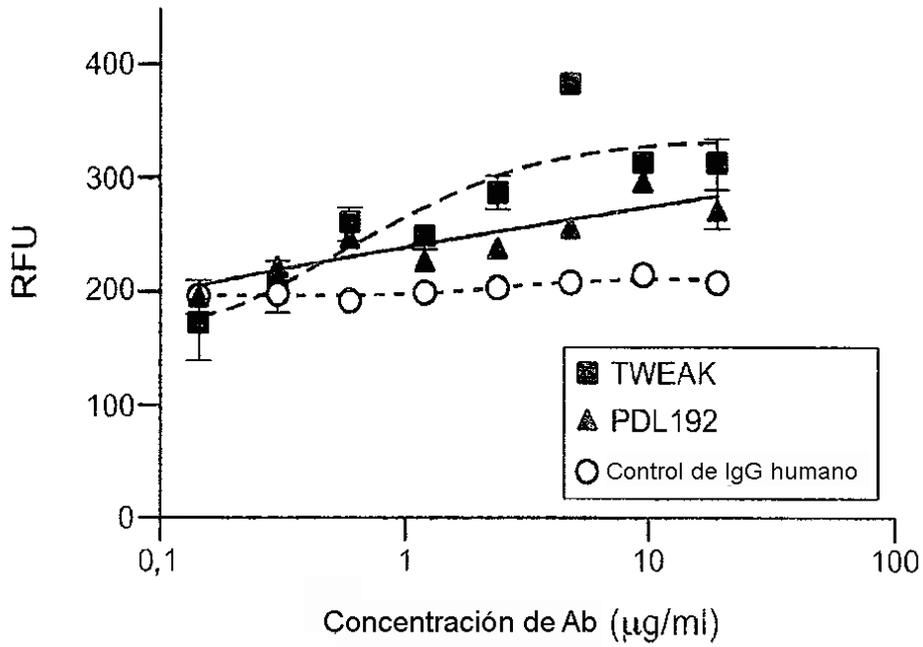


FIG. 10A

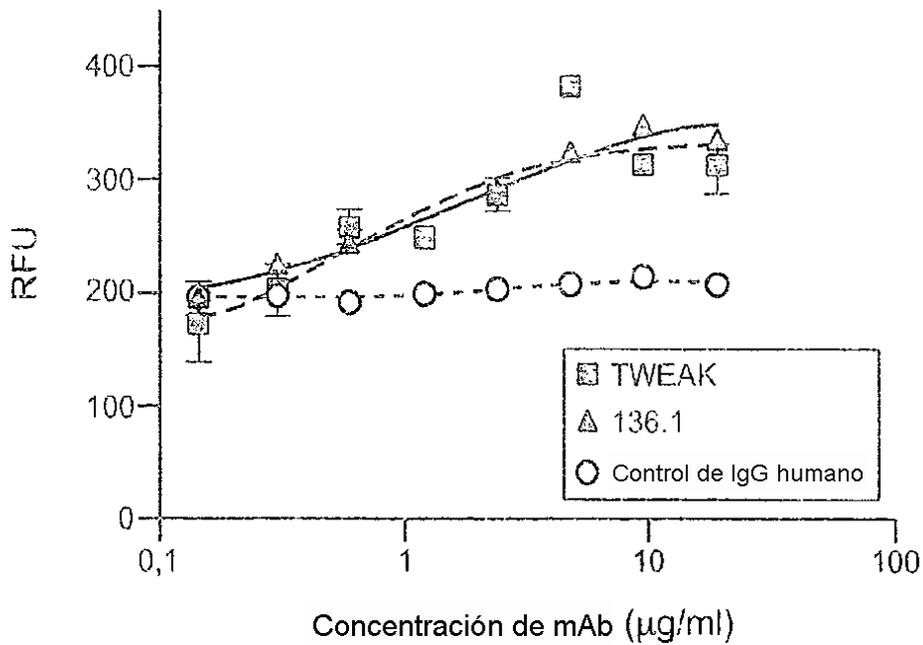


FIG. 10B

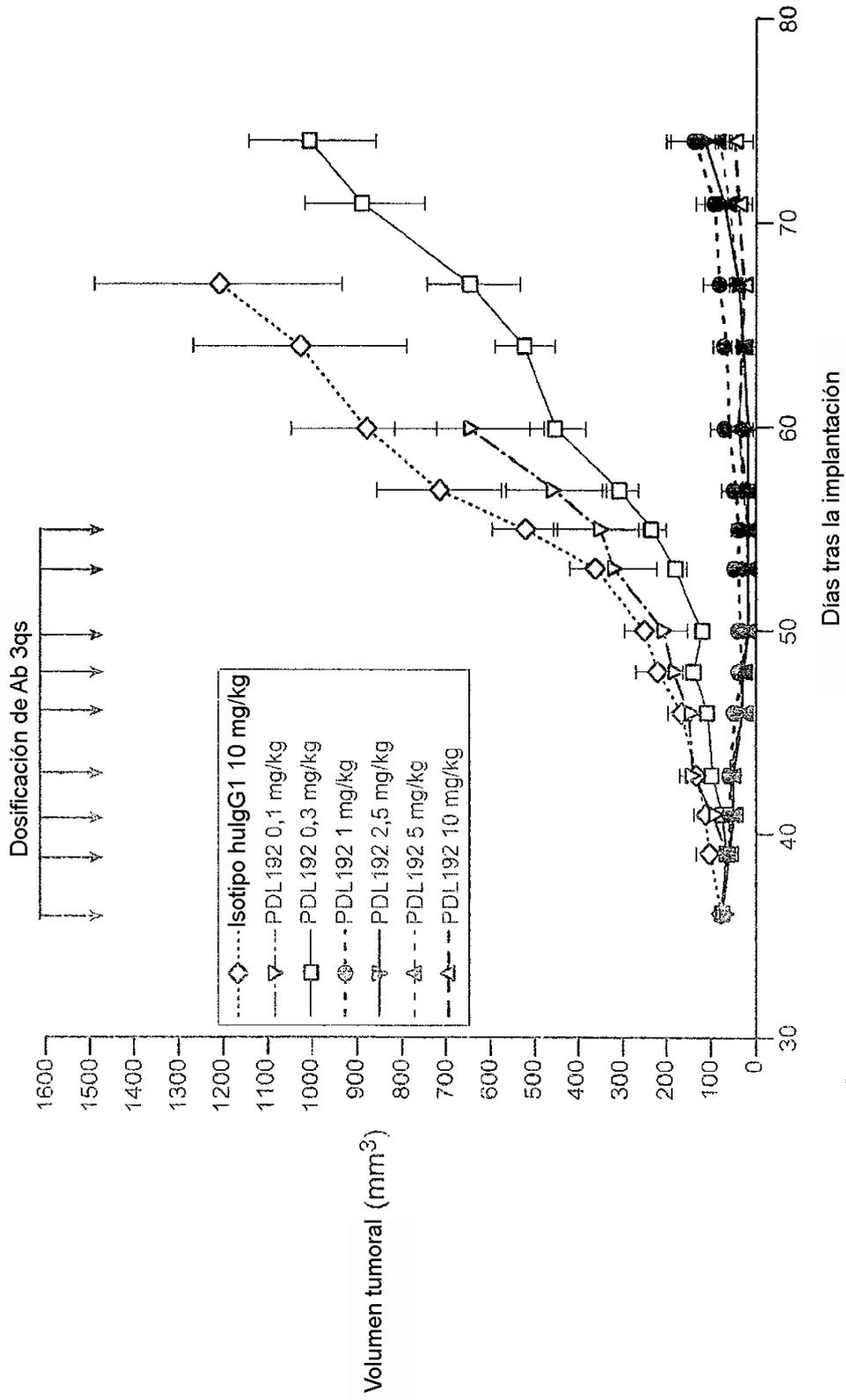


FIG. 11

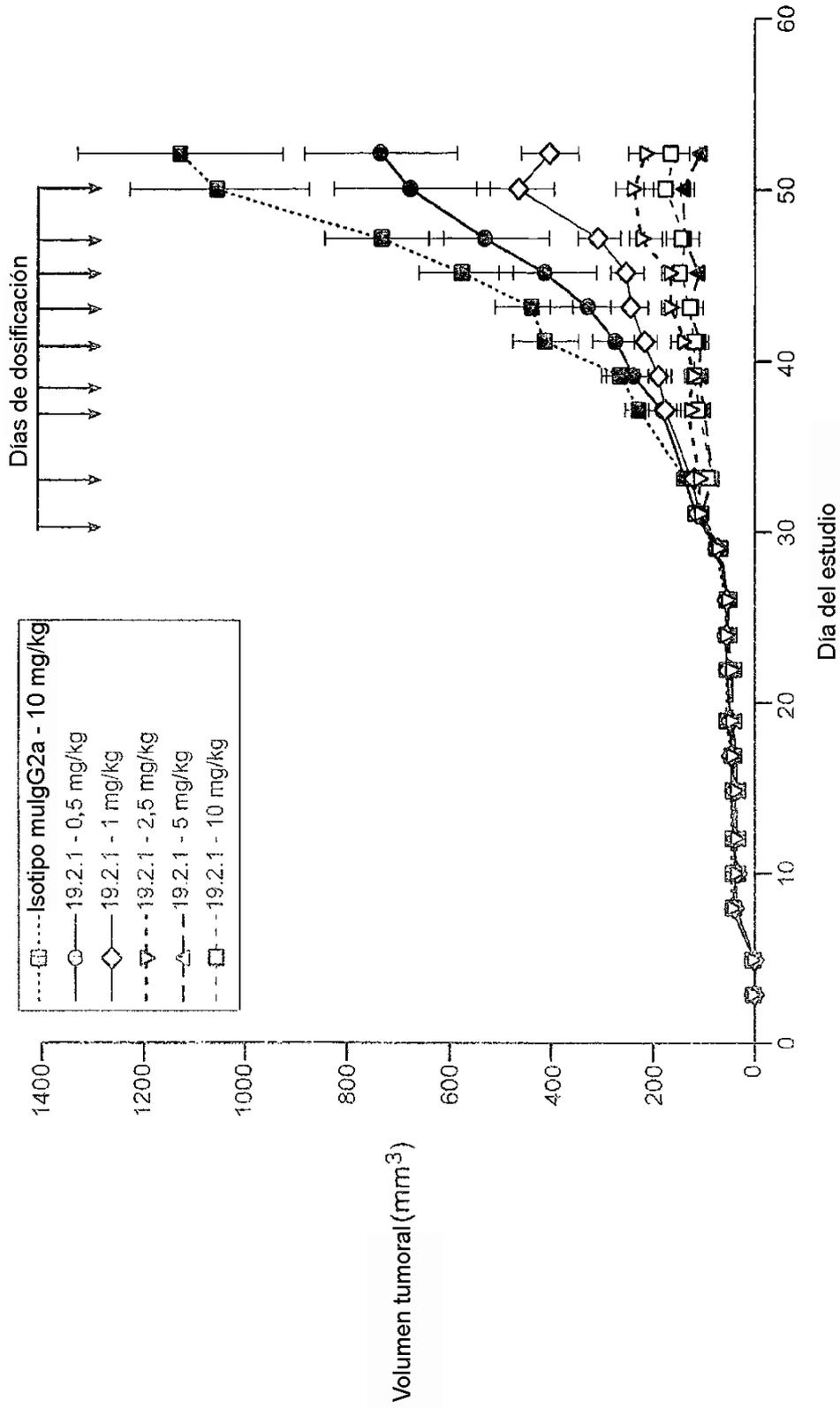


FIG. 12

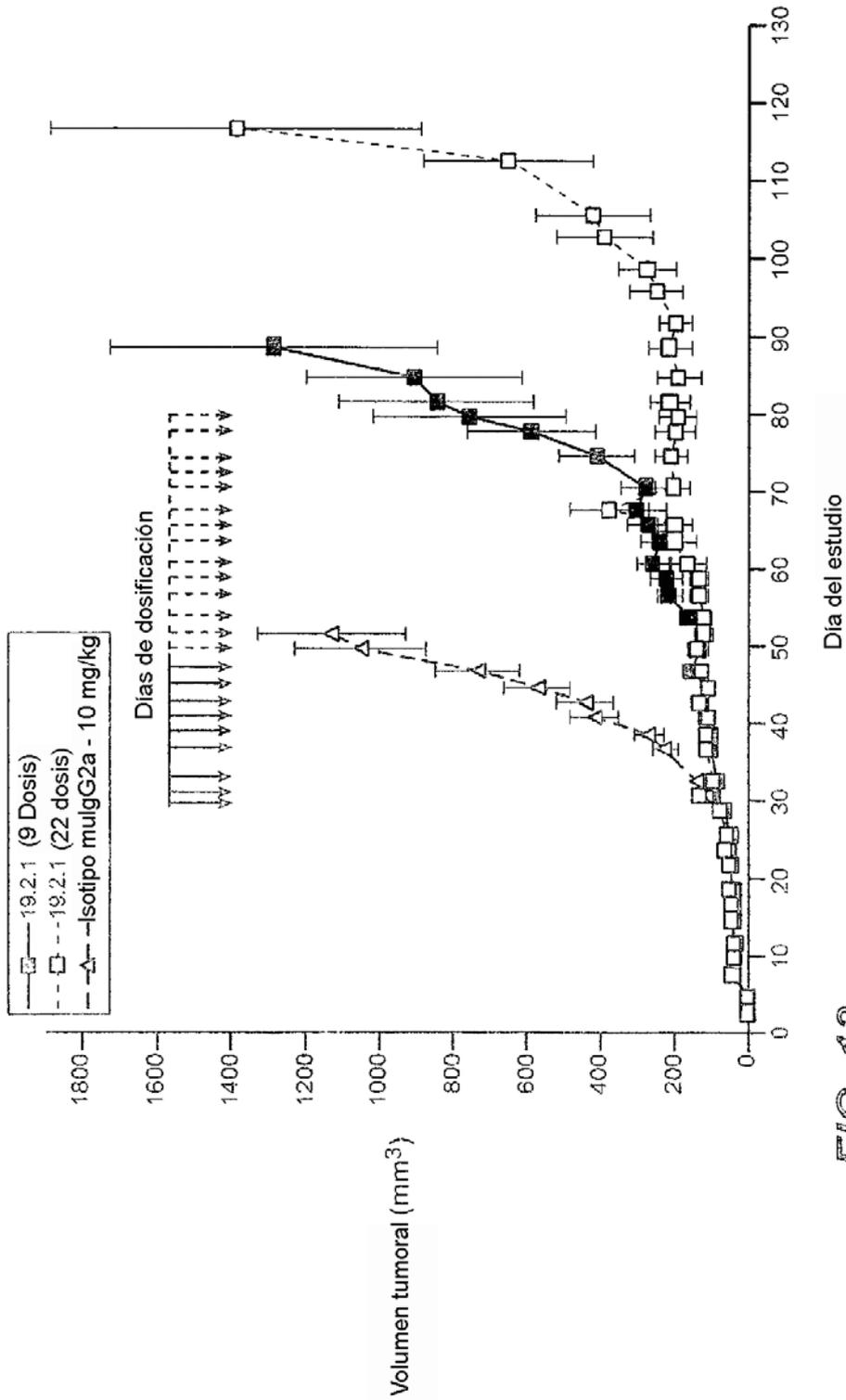


FIG. 13

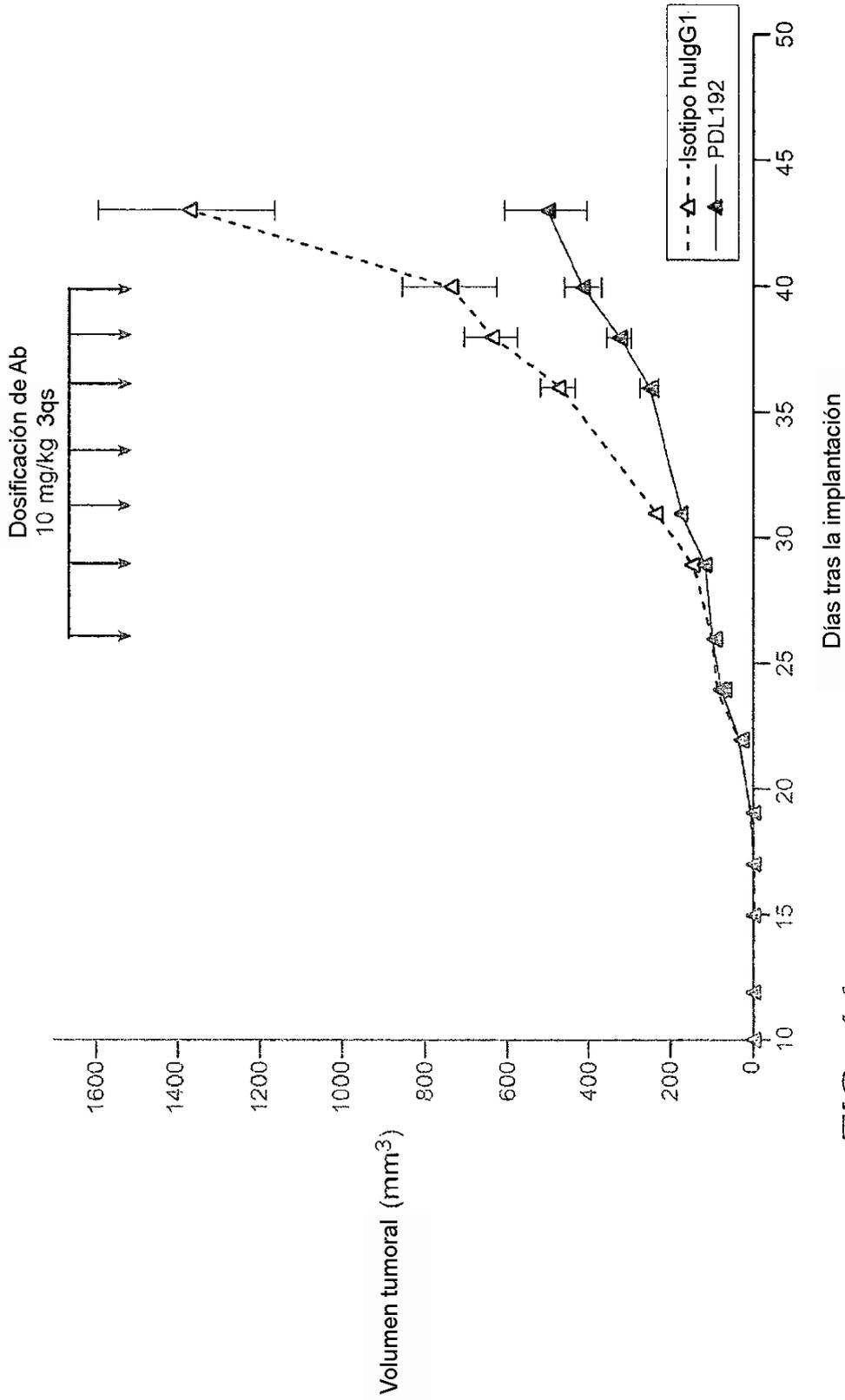


FIG. 14

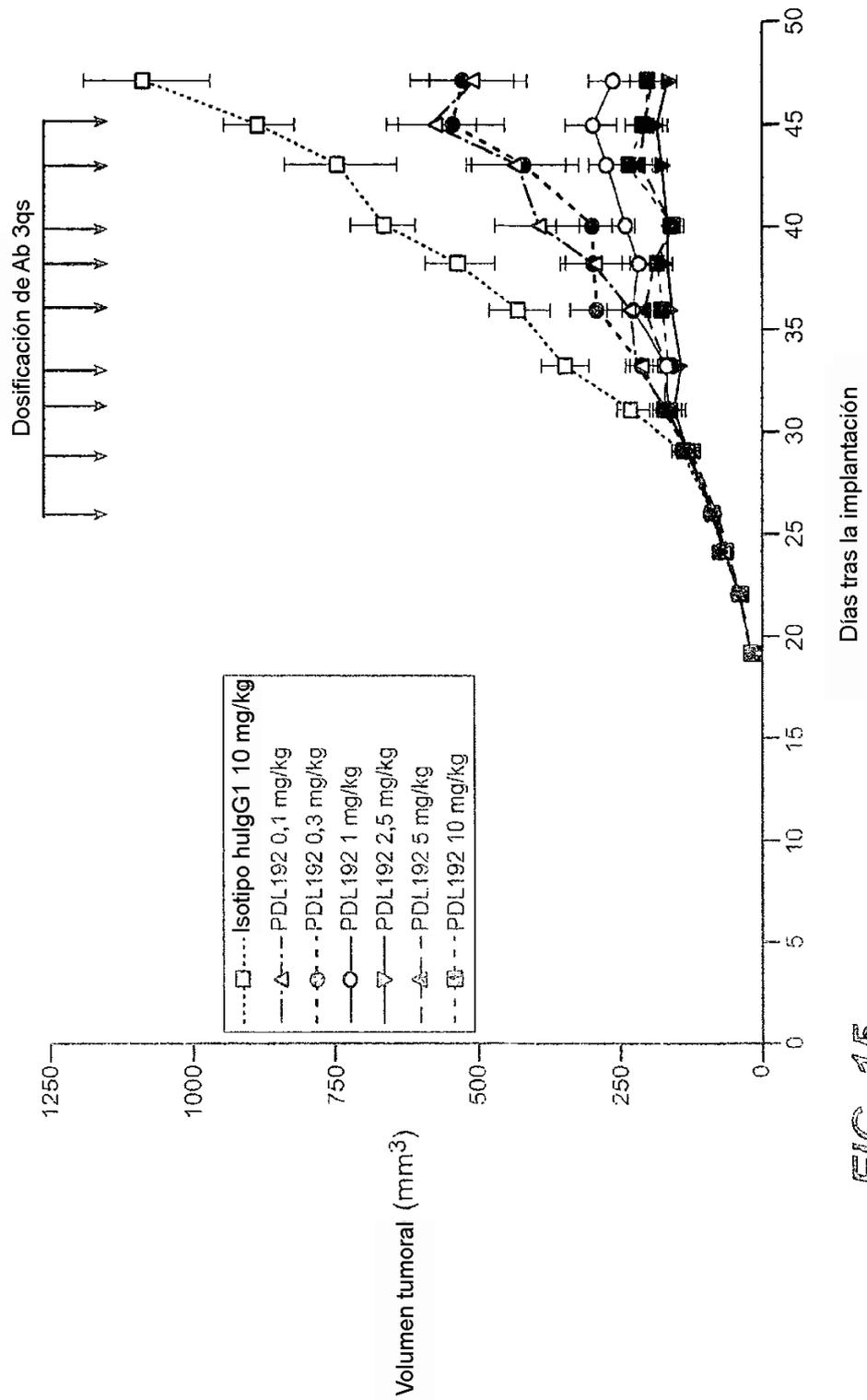


FIG. 15

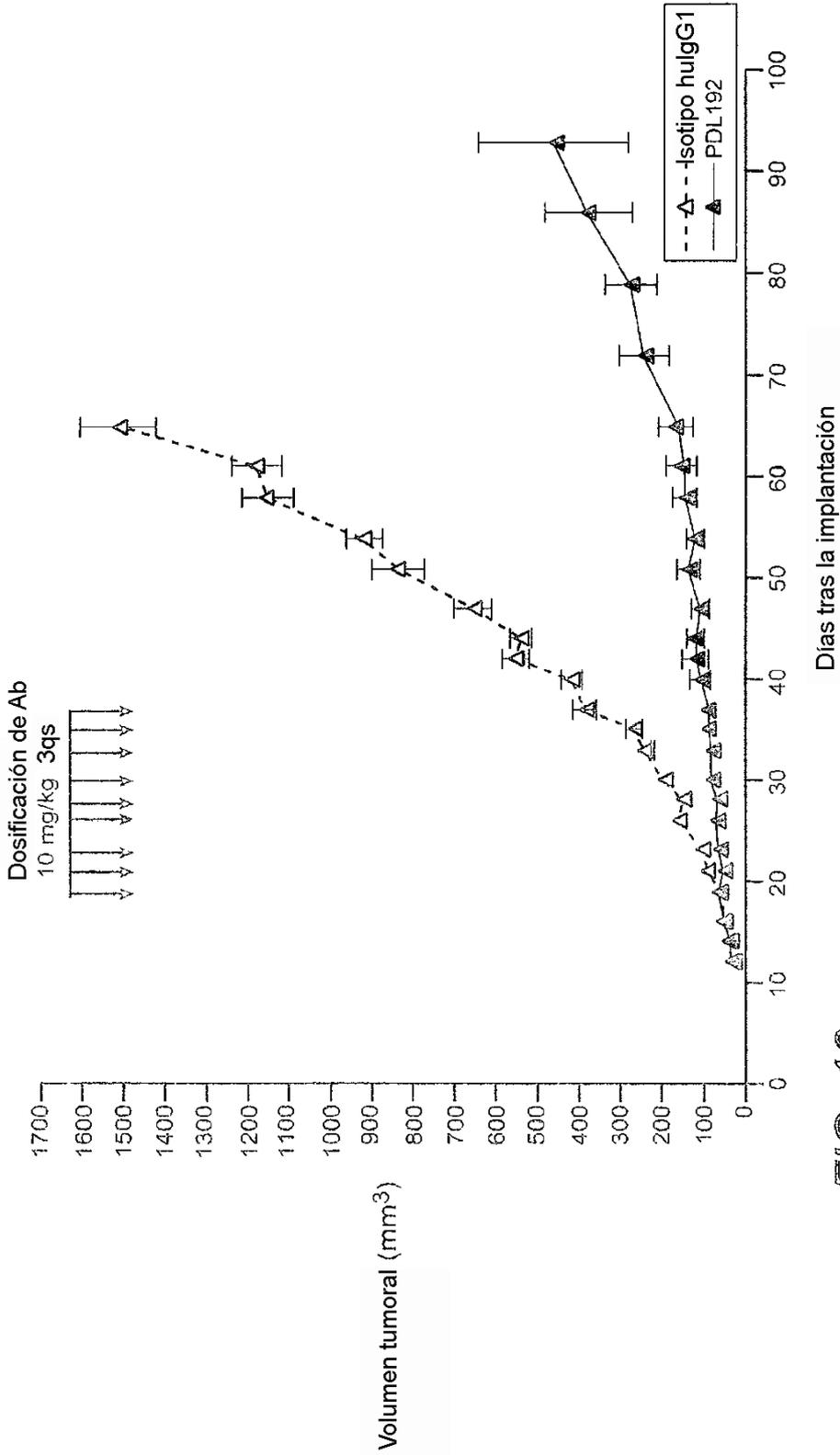


FIG. 16

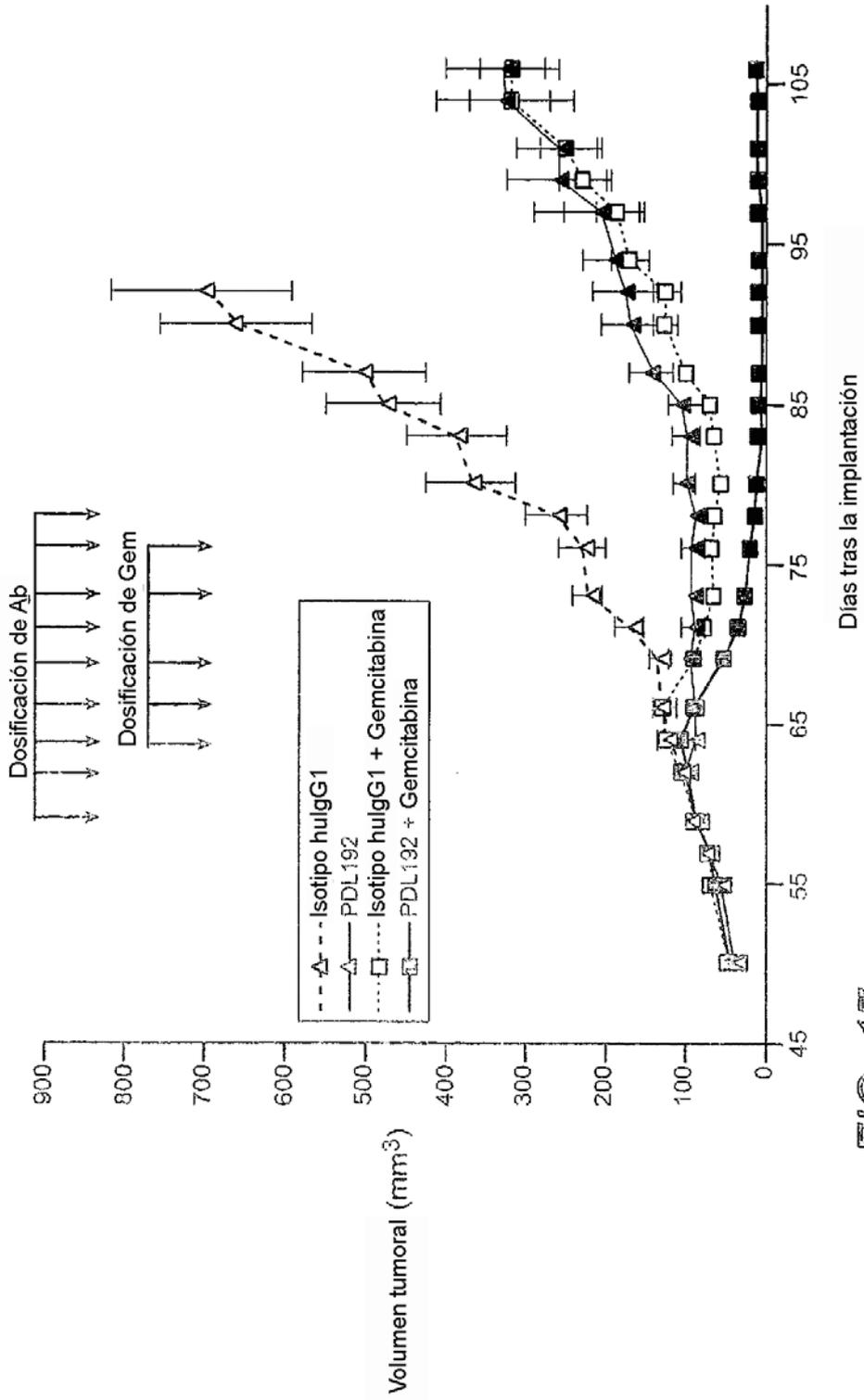


FIG. 17

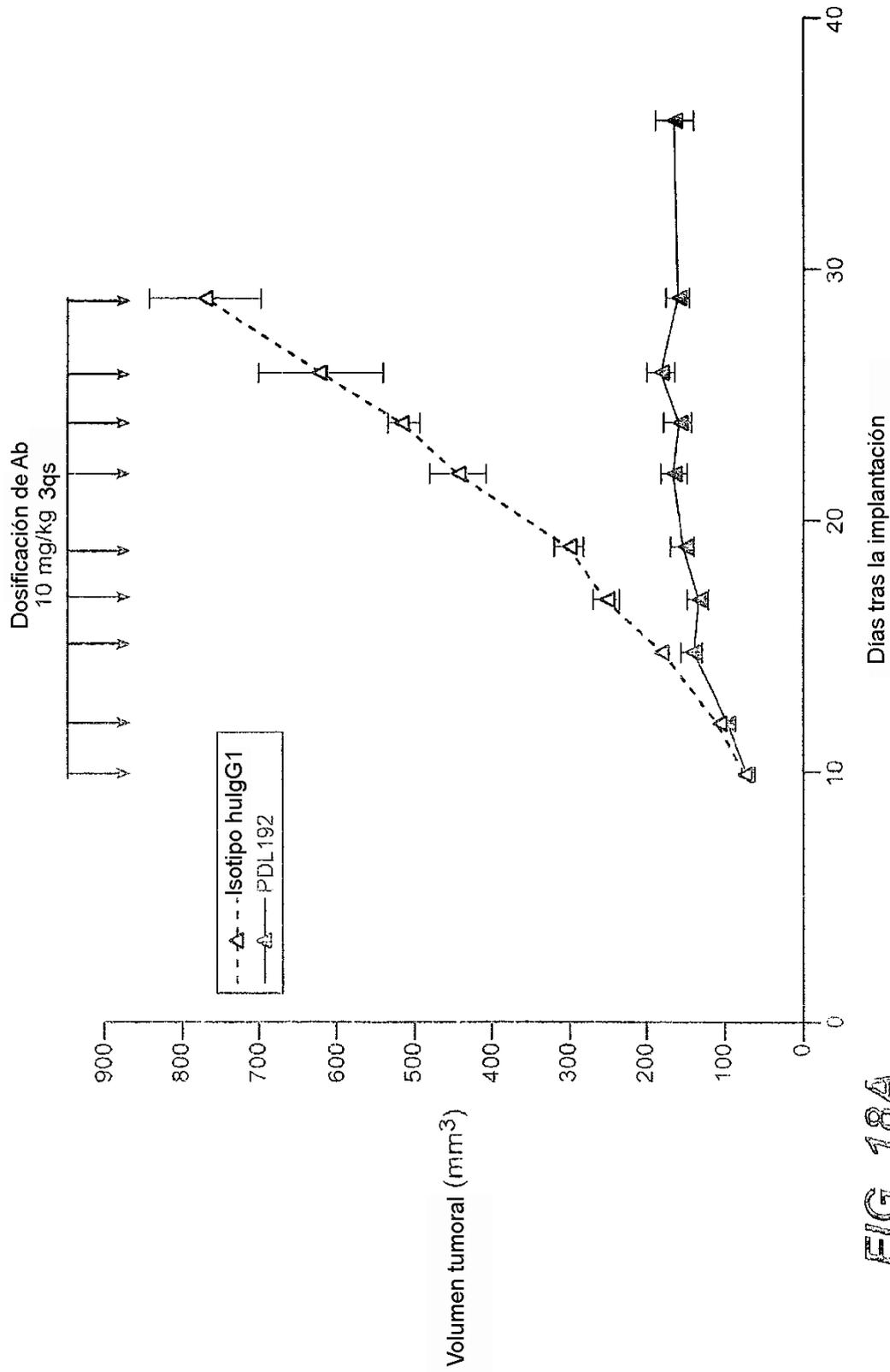


FIG. 18A

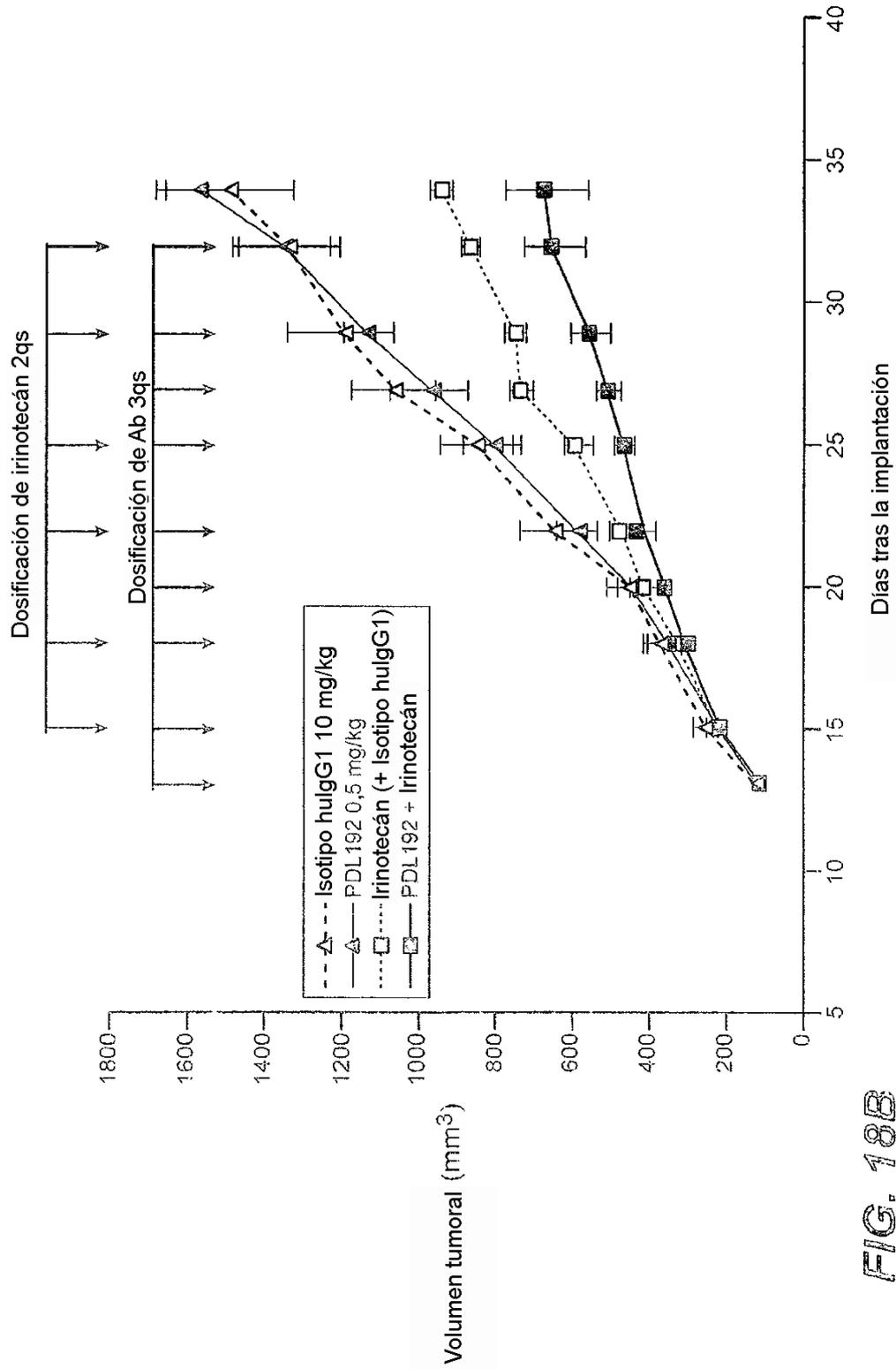


FIG. 18B

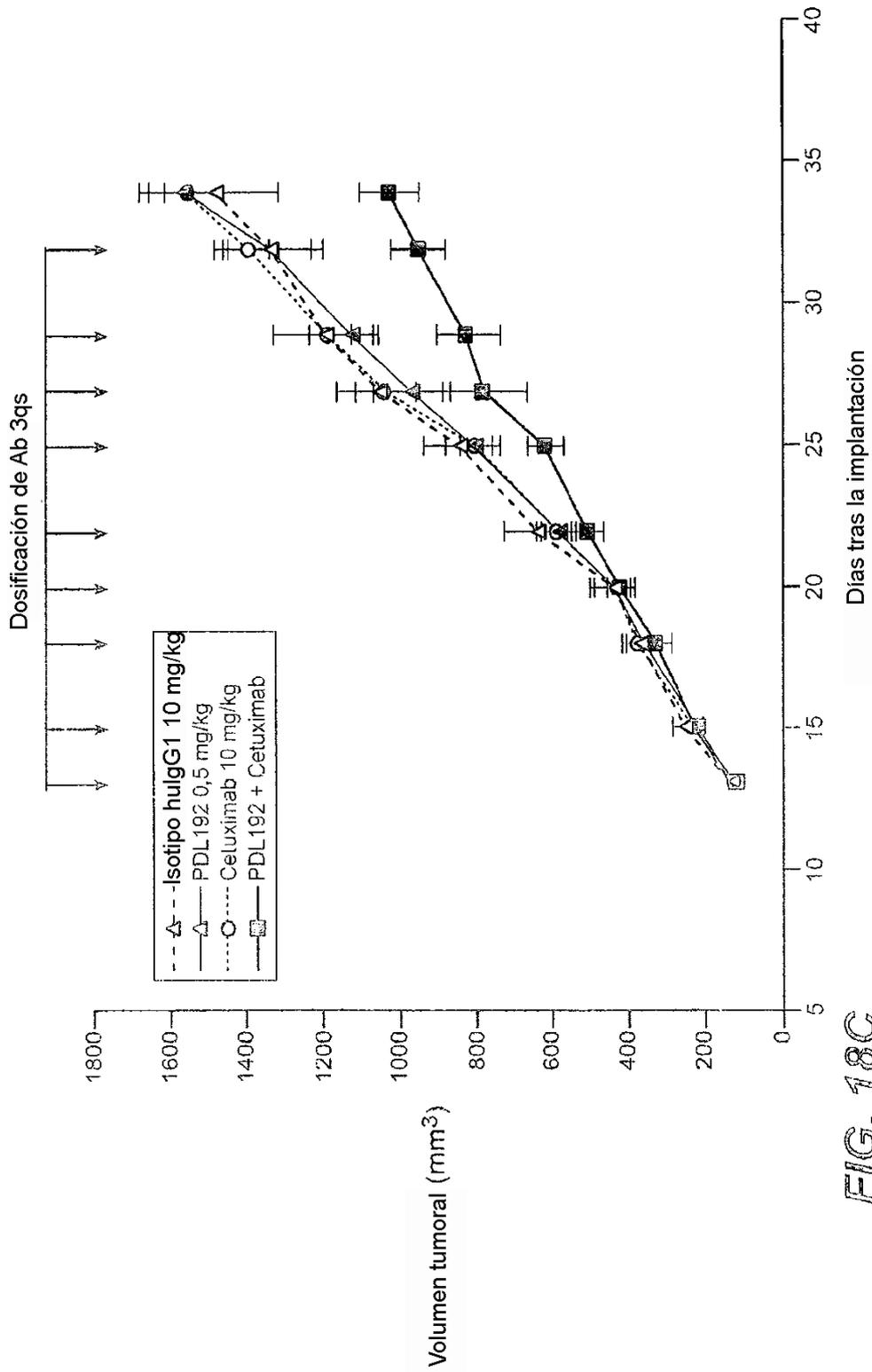


FIG. 18C

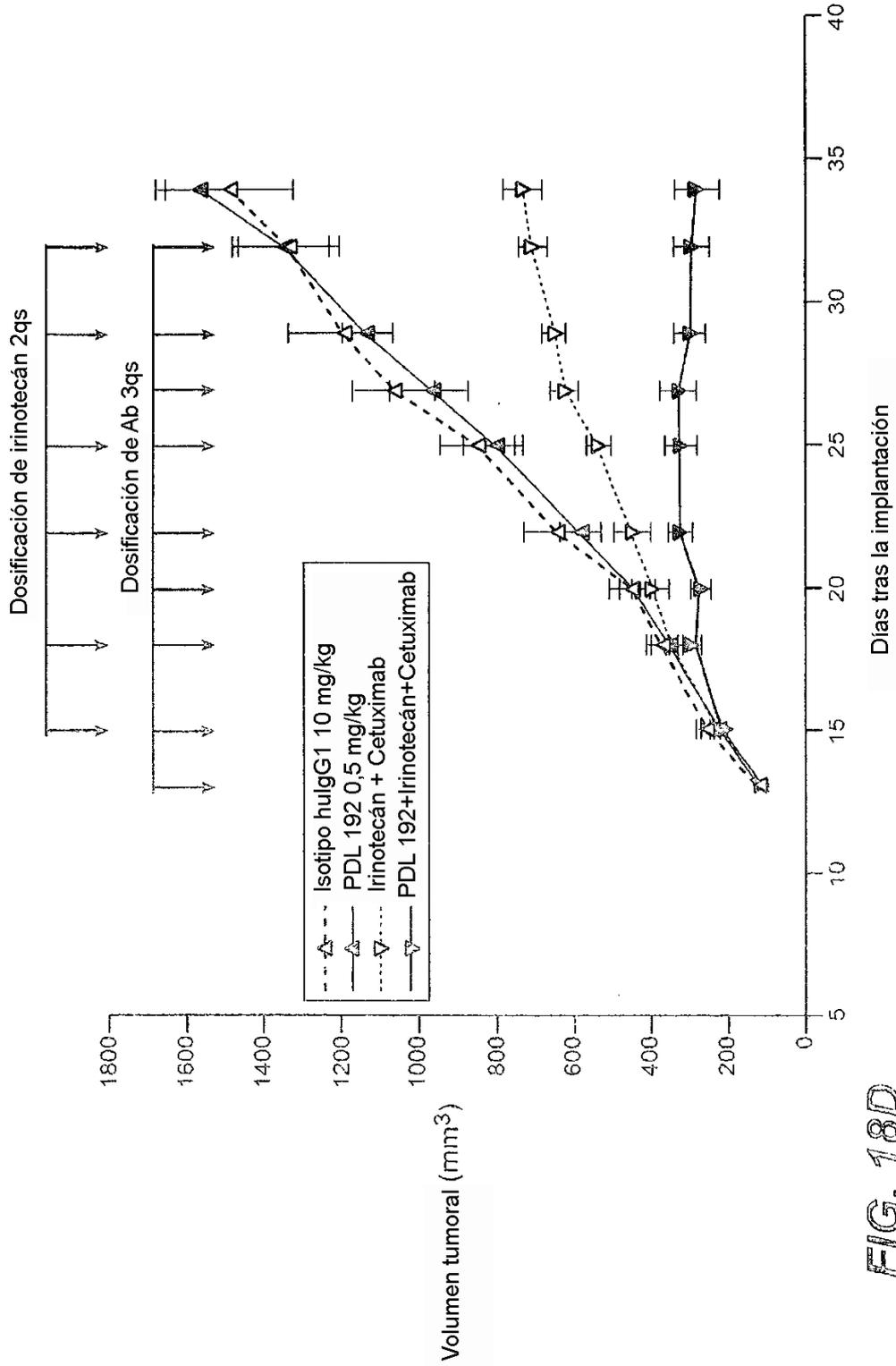


FIG. 18D

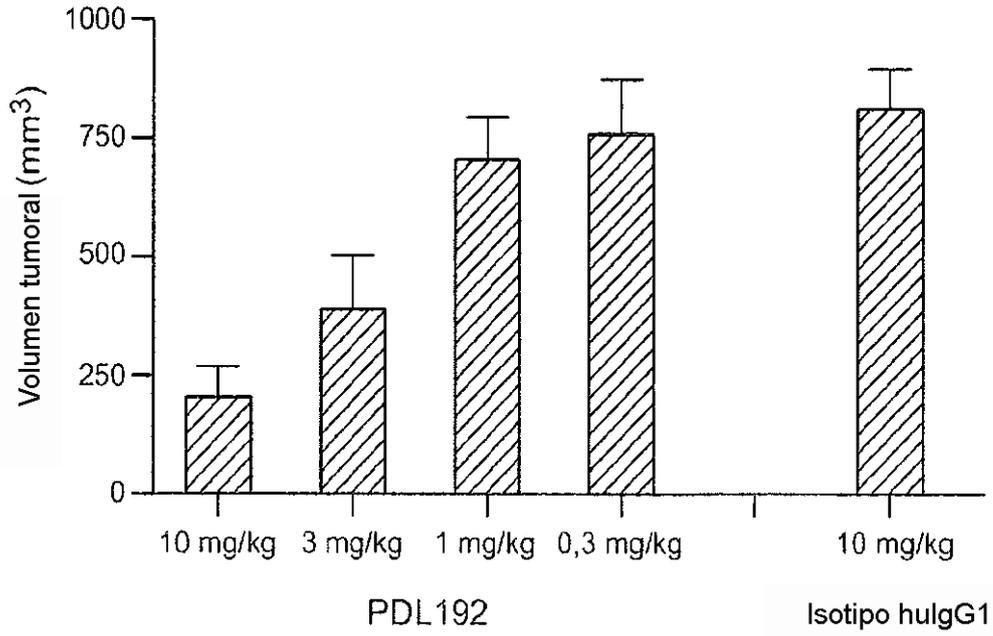


FIG. 19A

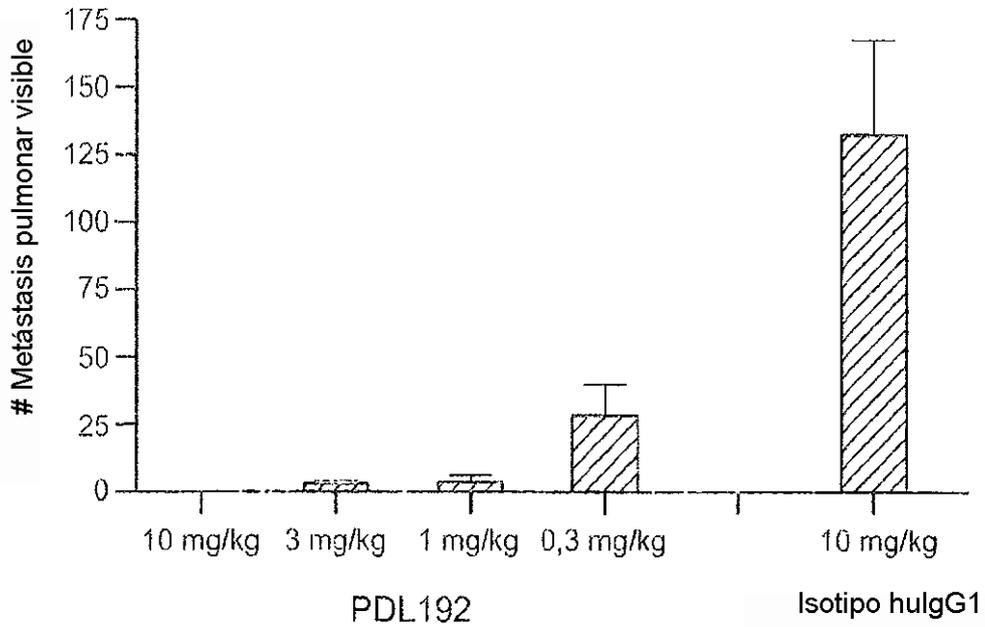


FIG. 19B

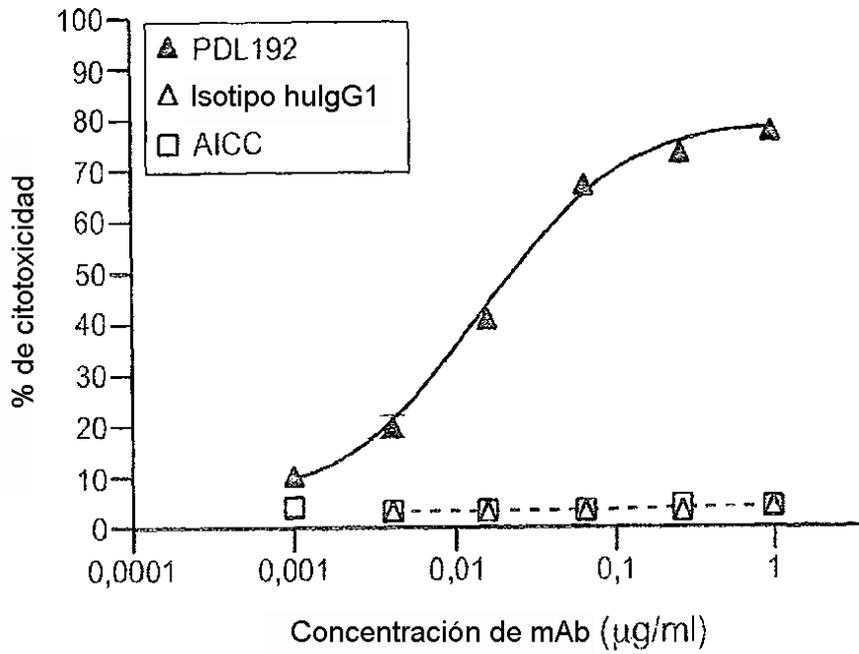


FIG. 20A

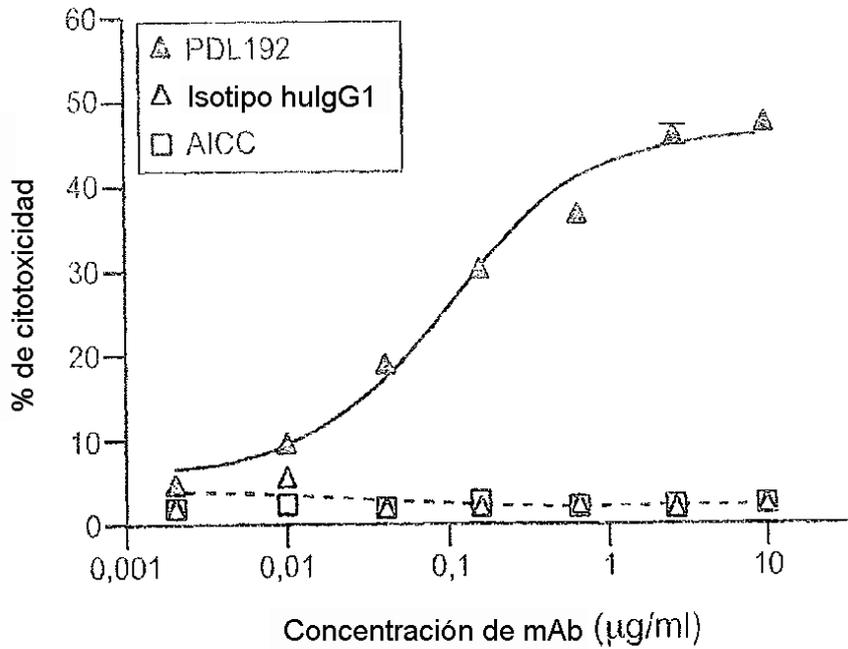


FIG. 20B

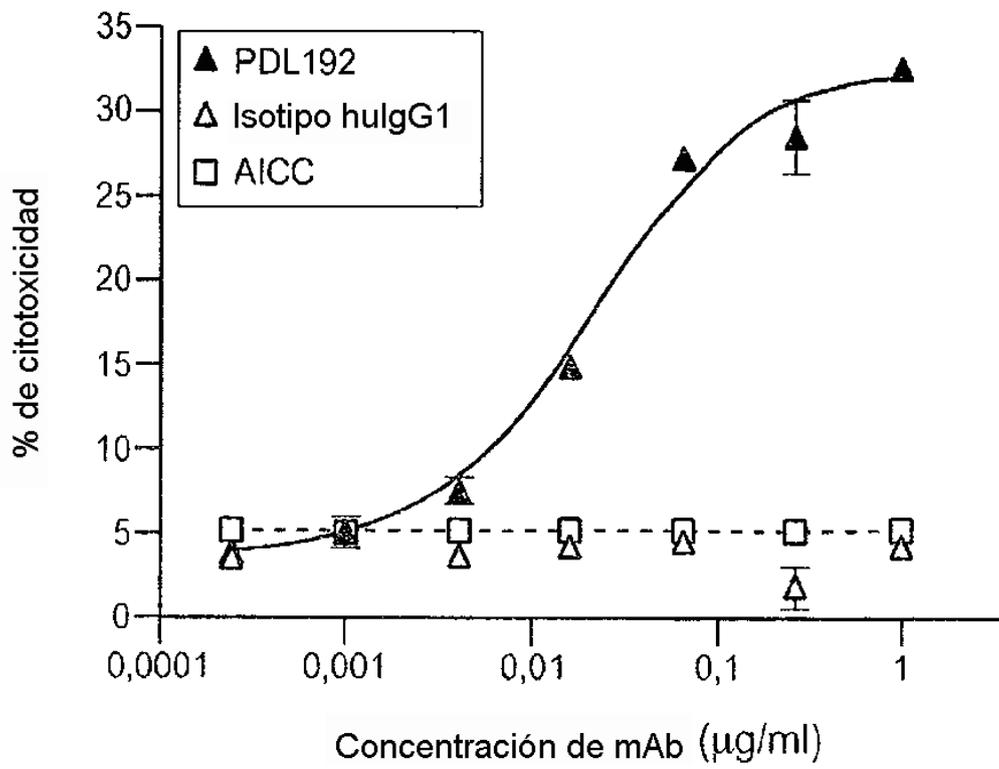


FIG. 20C

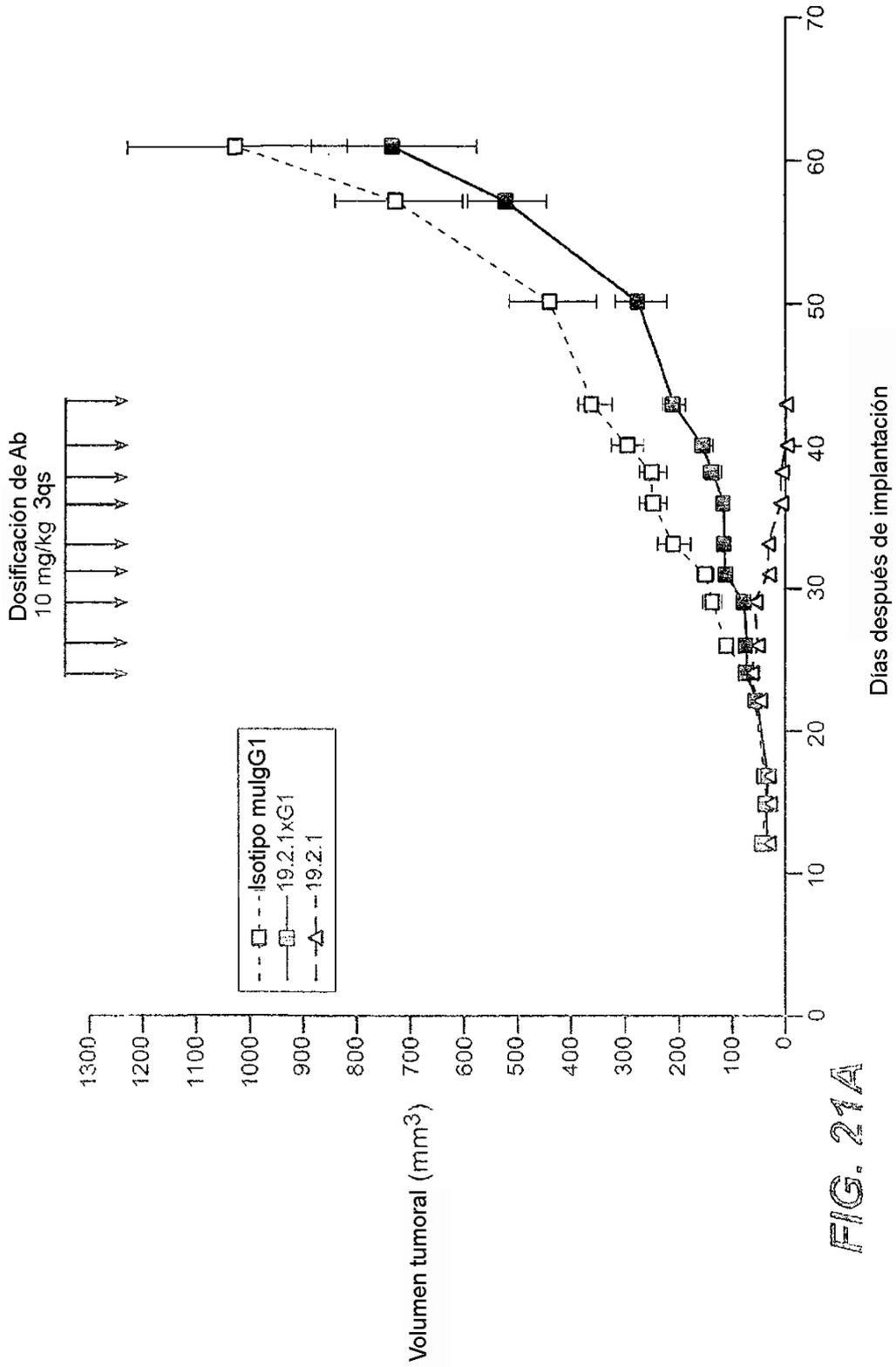


FIG. 21A

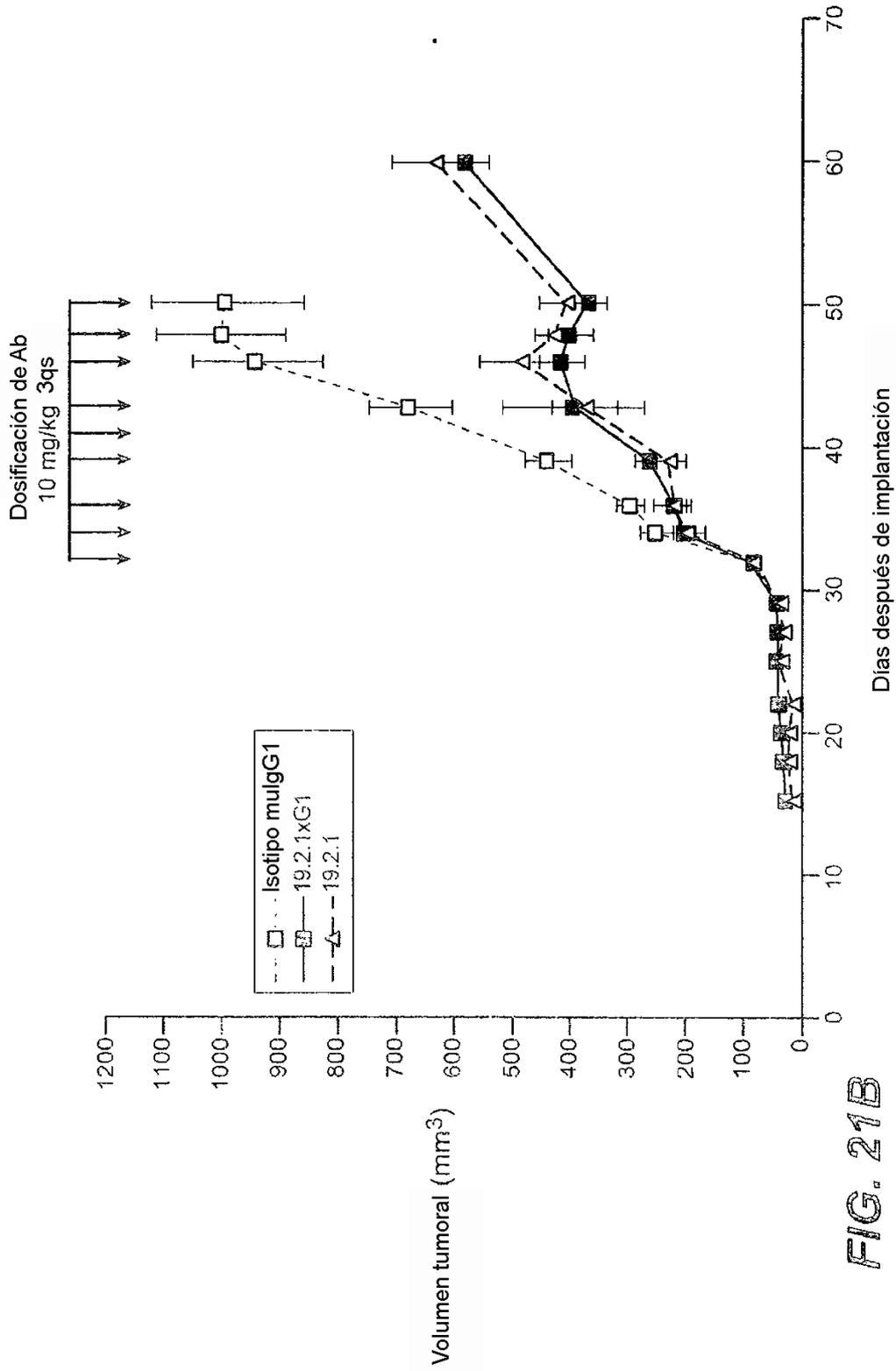


FIG. 21B

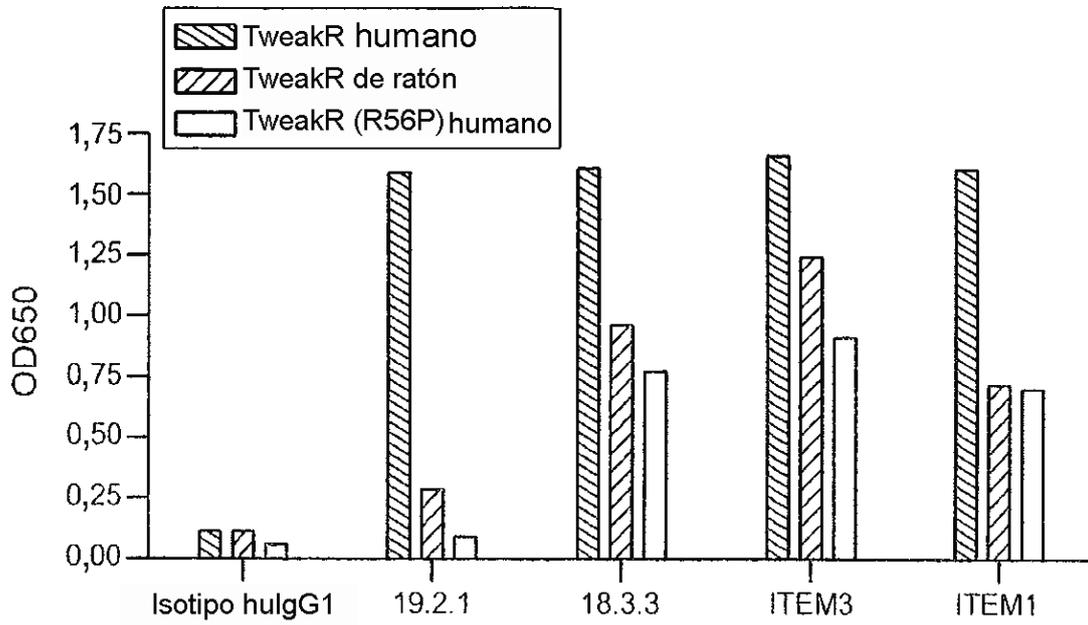


FIG. 22A

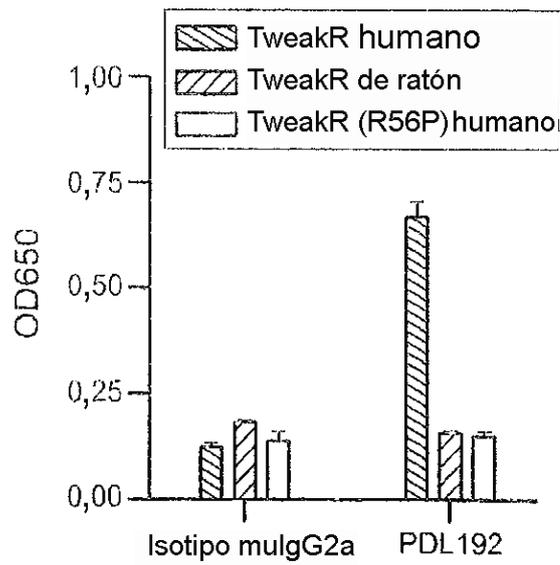


FIG. 22B